



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I  
DEL MEDI NATURAL

# **REGULACIÓN HORMONAL DE LA EXPRESIÓN DE miRNAs EN CULTIVOS PRIMARIOS DE PACIENTES CON ENDOMETRIOSIS Y MUJERES CONTROL**

TRABAJO DE FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

**AUTORA: MAR CUBERTORER NAVARRO**

TUTOR: JOSEP MARÍ ALEXANDRE

TUTOR ACADÉMICO: FRANCISCO MARCO JIMÉNEZ

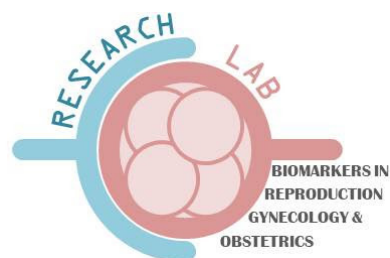
Curso Académico: 2018-2019

VALENCIA, septiembre de 2019

Reserva de todos los derechos de autor



**FUNDACIÓ**  
INVESTIGACIÓ  
HOSPITAL GENERAL  
UNIVERSITARI  
VALÈNCIA



## **Regulación hormonal de la expresión de miRNAs en cultivos primarios de pacientes con endometriosis y mujeres control.**

### **Resumen**

La endometriosis es una enfermedad ginecológica benigna, inflamatoria y dependiente de estrógenos que afecta al 6-10% de mujeres en edad reproductiva. Se trata de una enfermedad altamente invalidante caracterizada por la presencia de dolor en distintas circunstancias e infertilidad, afectando notablemente a la calidad de vida de las pacientes. Los estrógenos juegan un papel fundamental en su fisiopatología ya que promueven el crecimiento y la invasión de la lesión endometrial. Los microRNAs (pequeñas moléculas de RNA no codificantes) regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional. Hay evidencia de que la desregulación en la expresión de ciertos miRNAs está involucrada en la fisiopatología la endometriosis. No obstante, existen pocos trabajos acerca de la influencia de los estrógenos en la regulación de los miRNAs en esta patología, por lo que el objetivo principal del presente trabajo ha sido estudiar dicha influencia. Para ello, se han empleado cinco cultivos primarios de células estromales de endometrio de mujeres con y sin endometriosis y de lesiones endometriósicas, y una línea celular epitelial ya establecida. Tras la caracterización morfológica de las células de estudio, se ha determinado la presencia de ESR1 en todos los cultivos celulares, así como la viabilidad de la técnica de TRIzol para el aislamiento del RNA total sin sesgar la extracción de los miRNAs de interés (miR-99a-5p, let-7c-5p, miR-143-3p, miR-424-5p y miR-29c-3p). Además, mediante análisis bioestadísticos se ha establecido let-7c como normalizador frente a U6 snRNA. Finalmente, se ha observado que, tras el tratamiento con estradiol a dosis  $10^{-9}$  M, los miR-424-5p y miR-29c-3p aumentan en la línea celular epitelial Ishikawa y el miR-143-3p aumenta en los cultivos de células estromales procedentes de endometrio control y eutópico.

**Palabras clave:** endometriosis; miRNAs; regulación hormonal; cultivos celulares primarios; estrógenos; células estromales; inmunofluorescencia; RT-qPCR; PCR a tiempo final.

Alumna: Mar Cubertorer Navarro

Valencia, julio del 2019

Tutor: Josep Marí Alexandre

Tutor académico: Francisco Marco Jiménez

Reserva de todos los derechos de autor

## **Hormonal regulation of miRNA expression in primary cell cultures from women with endometriosis and control women.**

### **Abstract**

Endometriosis is a benign, inflammatory and estrogen-dependent gynecological disease that affects 6-10% of reproductive-age woman. It is a highly disabling disease characterized by the presence of pain in different circumstances and infertility, so it significantly affects the quality of life of the patients. Estrogens play a fundamental role in its pathophysiology as they promote the growth and invasion of the endometrial lesion, and microRNAs (small non-coding RNA molecules) regulate gene expression at the post-transcriptional level. There is evidence that deregulation in the expression of certain miRNAs is involved in endometriosis pathophysiology. However, there are few studies focused on the influence of estrogen in the regulation of miRNAs in this pathology, so the main objective of the present work has been to study this influence. For this purpose, five primary cell cultures of stromal endometrial cells from women with and without endometriosis and from endometriotic lesions have been used, as well as an established epithelial cell line. After the morphological characterization of the study cells, the presence of ESR1 in all cell cultures has been determined, as well as the feasibility of the TRIzol technique for the isolation of total RNA without biasing the extraction of the miRNAs of interest (miR- 99a-5p, let-7c-5p, miR-143-3p, miR-424-5p and miR-29c-3p). In addition, let-7c has been established as a normalizer by means of biostatistical analysis, instead of U6 snRNA. Finally, it has been observed that after the treatment with estradiol at a dose of  $10^{-9}$  M, miR-424-5p and miR-29c-3p expression has been increased in the Ishikawa epithelial cell line, and miR-143-3p in stromal cell culture coming from control and eutopic endometrium.

**Keywords:** endometriosis; miRNAs; hormonal regulation; primary cell culture; estrogen; stromal cells; immunofluorescence; RT-qPCR; final time PCR.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi tutor Josep por toda la ayuda que me ha dado durante estos últimos meses. He aprendido muchísimo gracias a ti, tanto de la vida como del trabajo en el laboratorio. Has sido un gran ejemplo de que, con trabajo y constancia se puede conseguir todo lo que uno se propone. A pesar de tener mil cosas que hacer a todas horas, siempre has encontrado tiempo para ayudarme. ¡Muchas gracias!

En segundo lugar, a Paula, mi compañera indispensable de laboratorio. Gracias por ayudarme siempre en todo y sobretodo por animarme en los momentos en los que no me veía capaz de nada. Ha sido genial conocerte. También agradecer al resto de compañeros del laboratorio, sin los que nos hubiéramos quedado a mitad en muchas técnicas.

Me gustaría agradecer también a mis amigos de clase, habéis sido todos imprescindibles estos últimos cuatro años. Gracias Laura por estar siempre ahí y resolver todas mis dudas, y también por acogerme en tu casa los últimos días, y Widad a ti gracias por todos los cafés y por acompañarme hasta el final siempre. También dar las gracias a mis amigos de Vila-real, sin vosotros no sería quien soy hoy, y en especial a Mar, Júlia e Irene por haber estado a mi lado todo el tiempo, apoyándome y haciendo que todo fuera más fácil.

Finalmente, agradecer a mi familia, en especial a mi madre y a mi padre por creer en mi en todo momento, y también a mi abuela y a mi tía por preocuparse y darme ánimos constantemente. Sois los mejores ejemplos que uno podría pedir en esta vida.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. EL ENDOMETRIO HUMANO	1
1.2. FISIOPATOLOGÍA DE LA ENDOMETRIOSIS	2
1.3. INFLUENCIA HORMONAL: DEPENDENCIA DE ESTRÓGENOS Y RESISTENCIA A PROGESTERONA	3
1.4. TRATAMIENTO DE LA ENDOMETRIOSIS	5
1.4.1. TRATAMIENTO HORMONAL	6
1.5. miRNAs	8
1.6. REGULACIÓN HORMONAL DE LOS miRNAs	9
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>10</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>11</b>
3.1. SUJETOS DE ESTUDIO	11
3.2. CULTIVOS CELULARES	11
3.2.1. CULTIVO DE LA LÍNEA CELULAR EPITELIAL ISHIKAWA	11
3.2.2. CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS ESTROMALES	12
3.3. ESTIMULACIÓN HORMONAL	12
3.5. EXTRACCIÓN DE RNA	13
3.6. SELECCIÓN DE LOS miRNAs DE INTERÉS	14
3.7. CUANTIFICACIÓN DEL ESR1 EN LOS CULTIVOS DE ESTUDIO	14
3.7.1. RT-PCR	14
3.7.2. DETECCIÓN DEL AMPLICÓN MEDIANTE GEL DE AGAROSA	15
3.7.3. INMUNOFLUORESCENCIA	16
3.8. CUANTIFICACIÓN DE miRNAs MEDIANTE RT-qPCR	16
3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	17
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>19</b>
4.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS CULTIVOS	19
4.1.1. LÍNEA CELULAR ISHIKAWA	19
4.1.2. CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS ESTROMALES	19

4.2.	ANÁLISIS DEL RECEPTOR ER $\alpha$ .....	20
4.2.1.	ANÁLISIS DE LA TRANSCRIPCIÓN DEL GEN ESR1 MEDIANTE RT-PCR.....	20
4.2.2.	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE ERA MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA .....	21
4.3.	INFLUENCIA DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE RNA EN LA CUANTIFICACIÓN DE MIRNAS POR RT-qPCR .....	22
4.4.	DETERMINACIÓN DEL NORMALIZADOR PARA LOS ESTUDIOS DE MIRNA22 .....	
4.5.	EXPRESIÓN BASAL DE LOS miRNAs DE INTERÉS EN LOS DISTINTOS TIPOS CELULARES .....	23
4.6.	CUANTIFICACIÓN DE LOS MIRNAS EN LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS MEDIANTE RT-qPCR.....	24
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>29</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>33</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>34</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>40</b>

**ÍNDICE DE TABLAS**

**Tabla 1.** Cebadores directos y reversos utilizados en la reacción de RT-PCR para la cuantificación del receptor ESR1 y el control de carga GAPDH.....15

**Tabla 2.** Cebadores utilizados en la reacción de RT-qPCR para la cuantificación de los miRNAs de estudio.....17

**Tabla 3.** Estabilidad de los distintos normalizadores en cada cultivo celular estudiado..... 23

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura del endometrio.....	2
<b>Figura 2.</b> Esquema del ciclo ovárico y del ciclo menstrual.....	4
<b>Figura 3.</b> Ciclo de retroalimentación positiva en la síntesis de estrógenos y prostaglandinas ..	7
<b>Figura 4.</b> Biogénesis de los miRNAs.....	8
<b>Figura 5.</b> Emparejamiento mRNA:miRNA.....	9
<b>Figura 6.</b> Plantilla de las placas de 24 pocillos utilizadas para la estimulación hormonal de los cultivos celulares.....	13
<b>Figura 7.</b> Diagrama de flujo del procedimiento experimental.....	18
<b>Figura 8.</b> Células epiteliales de la línea celular Ishikawa.....	19
<b>Figura 9.</b> Tinción fluorescente con Rhodamina-Phalloidina.....	19
<b>Figura 10.</b> Células estromales procedentes de tejido endometrial control de mujeres sanas, tejido endometrial eutópico y endometrioma ovárico de pacientes con endometriosis.....	20
<b>Figura 11.</b> Cuantificación mediante RT-PCR a tiempo final del receptor de estrógenos ESR1 y GAPDH.....	21
<b>Figura 12.</b> Inmunofluorescencia de una célula estromal procedente de endometrio eutópico de una paciente con endometriosis.....	21
<b>Figura 13.</b> Comparación entre el método de extracción de RNA del reactivo TRIzol y del kit mirVana.....	22
<b>Figura 14.</b> Resultados de la cuantificación basal de los miRNAs de interés.....	24
<b>Figura 15.</b> Resultados de la cuantificación de los microRNAs miR-99a-5p, miR-143-5p, miR-424 y miR-29c-3p en la línea epitelial Ishikawa tras los distintos tratamientos.....	25
<b>Figura 16.</b> Resultados de la cuantificación de los microRNAs estudiados en dos cultivos primarios estromales procedentes de endometrios control diferentes (E-1980 y E-1924) tras los distintos tratamientos.....	26
<b>Figura 17.</b> Resultados de la cuantificación de los microRNAs estudiados en dos cultivos primarios estromales procedentes de endometrio eutópico de pacientes con endometriosis (E-1919 y E-1971) tras los distintos tratamientos.....	27



**Figura 18.** Resultados de la cuantificación de los microRNAs miR-99a-5p (A), miR-143-5p (B), miR-424 (C) y miR-29c-3p (D) en un cultivo primario estromal procedente de un endometrioma ovárico de una paciente con endometriosis (E-1935) tras los distintos tratamientos..... 28

## ABREVIATURAS

AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
cDNA	ADN complementario
DMEM	Medio MEM modificado por Dulbecco
E <sub>2</sub>	17β-estradiol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EtOH	Etanol
ERα	Receptor de estrógenos α
ERE	Elemento de respuesta a estrógenos
ESR1	Gen que codifica para el receptor de estrógenos α
FBS	Suero bovino fetal
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
Gln	Glutamina
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina
IGFBP-1	Factor de crecimiento similar a la insulina
MEC	Matriz extracelular
MEM	Medio mínimo esencial de <i>Eagle</i>
mRNA	ARN mensajero
miRNAs o miR	microARNs
NHRs	Receptores hormonales nucleares
OMA	Endometrioma ovárico
P <sub>4</sub>	Progesterona
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGR	Gen que codifica para el receptor de progesterona

PR	Receptor de progesterona
PRL	Prolactina
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNA
RT	Retrotranscripción o Temperatura ambiente (según contexto)
RT-qPCR	PCR cuantitativa con transcriptasa reversa
siRNA	ARN pequeño de interferencia
TAE	Tris-acetato-EDTA
VEGF-A	Factor de crecimiento endotelial vascular de tipo A

## **FINANCIACIÓN**

Este trabajo ha sido financiado por el 'Instituto de Salud Carlos III' y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) 'Unión Europea, una manera de hacer Europa' (PI17/01945).

# **1. INTRODUCCIÓN**

## **1.1. ENDOMETRIOSIS**

La endometriosis es una enfermedad ginecológica benigna, inflamatoria y dependiente de estrógenos que afecta al 6-10% de mujeres en edad reproductiva. Se estima que su prevalencia mundial es de aproximadamente 176 millones de afectadas, según la Sociedad Mundial de Endometriosis (World Endometriosis Society, 2019).

La endometriosis se caracteriza por la presencia de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina (Giudice and Kao 2004), principalmente en el peritoneo (denominados implantes peritoneales), en los ovarios (denominados endometriomas ováricos) y como lesiones infiltrativas profundas que pueden extenderse al intestino, a la vejiga y al uréter (Marí-Alexandre *et al.*, 2016). También se ha descrito la presencia de implantes en localizaciones atípicas como el pericardio, los pulmones e incluso el cerebro (Giudice, 2014). Sus principales síntomas son dolor en distintas circunstancias (dolor pélvico crónico, dismenorrea, dispareunia, disuria, disquecia), sangrado uterino irregular y/o infertilidad (Burney and Giudice, 2012). A pesar de esta variedad de síntomas, el diagnóstico de la endometriosis tiene un retraso estimado de 7 años (Noaham *et al.*, 2011), debido a la falta de biomarcadores no invasivos y consistentes, y a la tendencia a infravalorar sus síntomas. Todo ello conlleva a una reducción significativa en la calidad de vida de las pacientes (Parasar *et al.*, 2017).

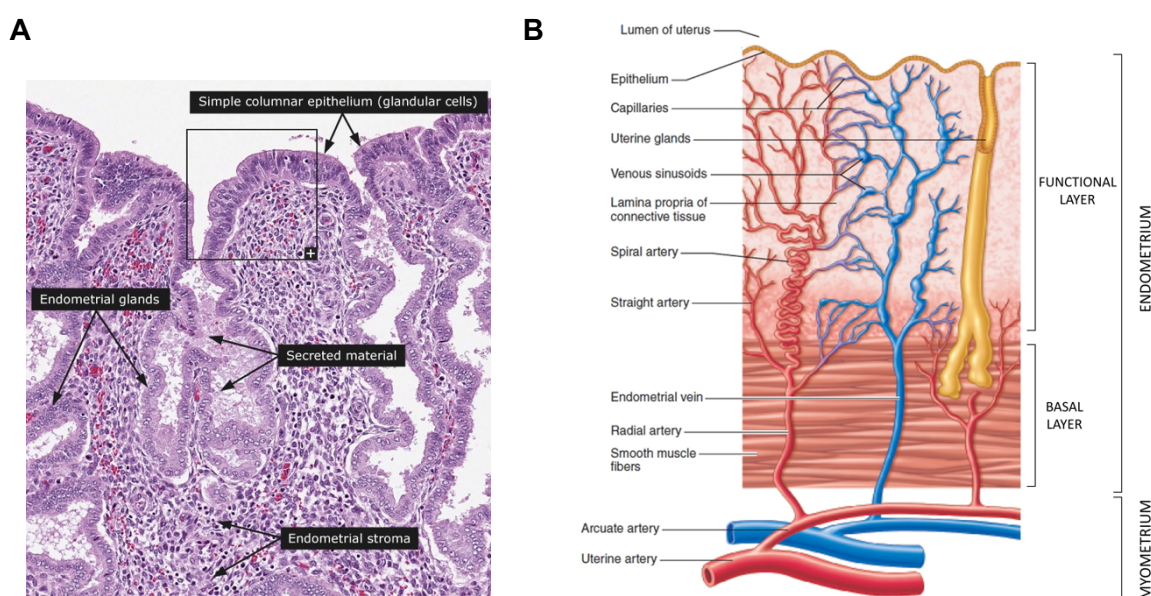
Distintos factores reproductivos se han asociado con el riesgo a padecer endometriosis, sugiriendo que las variaciones hormonales podrían tener un impacto significativo en su desarrollo. Por ejemplo, la menarquia temprana y los ciclos menstruales cortos están relacionados con un aumento del riesgo, mientras que la paridad y el uso de anticonceptivos orales se asocian con una disminución (Parasar *et al.*, 2017).

## **1.1. EL ENDOMETRIO HUMANO**

El endometrio es el revestimiento de la mucosa del útero y tiene como función básica la creación de un ambiente adecuado para la implantación del embrión (Bischof and Campana, 1996). Es un tejido sensible a las hormonas esteroideas y a los factores proteicos locales y está compuesto por epitelio luminal y glandular, estroma y células musculares lisas vasculares (Keefe and Wright, 2007). El compartimento estromal está

formado por células fibroblásticas, vasos sanguíneos y una variedad de células inmunocompetentes (Buckley and Fox, 1989).

Clásicamente, el endometrio de las mujeres en edad reproductiva se ha dividido en dos compartimentos: la capa funcional superior transitoria y la capa basal inferior permanente (**Fig. 1**). La capa funcional es adyacente a la cavidad uterina y se forma tras la menstruación: el aumento en la concentración de estrógenos durante la fase folicular del ciclo menstrual induce su proliferación. Sufre cambios de secreción caracterizados por la acumulación de glucógeno y otros productos, y su función principal consiste en facilitar la implantación del blastocisto. Durante la menstruación, la capa funcional se desprende. La capa basal, adyacente al miometrio, está formada por pliegues glandulares más profundos y por estroma densamente organizado (Keefe and Wright, 2007). Esta capa es capaz de regenerar la zona funcional después del desprendimiento menstrual.



**Figura 1. Estructura del endometrio.** Arquitectura histológica del endometrio humano (tinción hematoxilina-eosina) (A). (Human Protein Atlas, disponible en: <https://www.proteinatlas.org/learn/dictionary/normal/endometrium>). Descripción esquemática de las capas endometriales (B). (Figura adaptada de HealthJade, disponible en: <https://healthjade.net/endometrial-cancer/>).

## 1.2. FISIOPATOLOGÍA DE LA ENDOMETRIOSIS

A pesar de su elevada prevalencia y de sus síntomas incapacitantes, el mecanismo etiopatogénico exacto de la endometriosis constituye aún hoy en día un área activa de investigación (Zondervan *et al.*, 2018). Aunque se han propuesto diversas teorías para

tratar de explicar la etiopatogenia de la endometriosis, la más aceptada es la de la menstruación retrógrada, expuesta por J.A. Sampson en 1927. Según esta teoría, el endometrio descamado durante la menstruación puede llegar mediante flujo retrógrado a través de las trompas de Falopio hasta la cavidad abdominal, donde puede implantarse en distintas localizaciones (Sampson, 1927). Sin embargo, aunque el 90% de mujeres en edad fértil experimentan menstruación retrógrada, tan solo un bajo porcentaje de ellas (10-15%) desarrollan la enfermedad (García-Velasco and Quea, 2007), lo que sugiere que debe haber mecanismos adicionales que permitan al tejido migrado implantarse y sobrevivir. Ejemplos de estos mecanismos son la predisposición genética, la dependencia de estrógenos, la resistencia a progesterona y la inflamación (Burney and Giudice, 2012).

Se cree que se trata de una enfermedad multifactorial y poligénica, y gracias a los estudios realizados los últimos años, se tiene evidencia de que la desregulación en la expresión de ciertos miRNAs puede estar involucrada en su fisiopatología (Gilabert-Estellés et al., 2012), como se comentará más adelante.

### **1.3. INFLUENCIA HORMONAL: DEPENDENCIA DE ESTRÓGENOS Y RESISTENCIA A PROGESTERONA**

Las hormonas esteroideas ováricas regulan la función endometrial y la menstruación ovárica. Durante la etapa reproductiva de la mujer, el estradiol circulante y la progesterona inducen cambios cíclicos en el endometrio, que tienen como objetivo final la preparación para la implantación del blastocisto (Henriet *et al.*, 2012).

El ciclo menstrual se divide clásicamente en tres fases que están influenciadas por fluctuaciones en las concentraciones de las hormonas esteroideas ováricas: la fase proliferativa, la secretora y la menstrual (**Fig. 2**). Durante la **fase proliferativa**, la capa funcional del endometrio se engrosa en respuesta al aumento de los niveles de estradiol, produciéndose la proliferación de las células epiteliales, estromales y endoteliales. Durante la **fase secretora** (que comienza después de la ovulación), la progesterona producida por el cuerpo lúteo actúa sobre un endometrio que ha estado expuesto a elevadas concentraciones de estrógenos. El endometrio responde al rápido aumento de progesterona para mantener la receptividad endometrial en caso de que ocurra la fecundación del óvulo y la posterior implantación embrionaria. Las glándulas acumulan glucógeno y glicoproteínas, y se van desarrollando progresivamente vasos en espiral.

Al final de la fase secretora, las células estromales de la capa funcional experimentan la decidualización, un proceso crucial para que el embrión pueda implantarse en el endometrio (Henriet *et al.*, 2012). Las células del estroma se vuelven más redondas y el tamaño de su citoplasma aumenta. Incrementa la producción de prolactina (PRL), de la proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP-1) y de glucógeno, proporcionando una matriz nutritiva e inmunoprivilegiada esencial para la implantación del embrión y el desarrollo placentario (Gellersen and Brosens, 2012). La decidualización comienza alrededor de las arteriolas espirales y se va expandiendo a la capa superficial del endometrio. Cuando los niveles de progesterona y de estrógenos disminuyen se produce la **fase menstrual** y la capa funcional del endometrio se desprende.

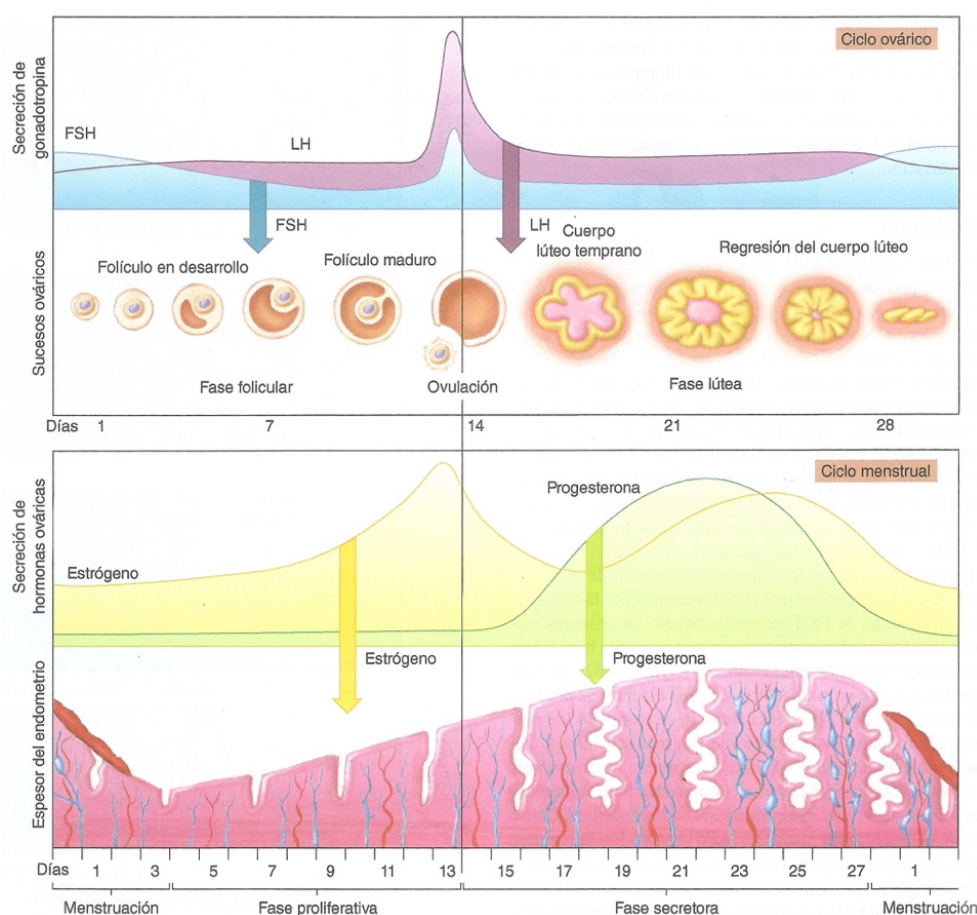


Figura 2. Esquema del ciclo ovárico y del ciclo menstrual (Fox, S. *Fisiología humana*, 14e).

Las alteraciones hormonales pueden influir en la capacidad de las células endometriales para proliferar, adherirse al mesotelio y/o evadir la eliminación mediada por el sistema inmunitario (Burney and Giudice, 2012). A nivel molecular, la endometriosis está caracterizada por una elevada expresión de receptores de estrógeno y una resistencia a la progesterona en el tejido endometriósico. Tanto el receptor de estrógenos como el receptor de progesterona pertenecen a una gran familia de receptores nucleares



denominada *nuclear hormone receptors* (NHRs). Actúan como factores de transcripción y su actividad está modulada por las hormonas esteroideas correspondientes que difunden a través de la membrana plasmática y permiten que las señales extracelulares sistémicas regulen eventos intracelulares específicos del tejido (Ayaz *et al.*, 2019). El 17 $\beta$ -estradiol interacciona con ESR1 y se forma un heterodímero que interactúa con secuencias de DNA específicas, activando su transcripción, promoviendo el crecimiento y la invasión de la lesión endometrial y favoreciendo la aparición del dolor y la inflamación.

Por otra parte, en los implantes endometriales ectópicos la aromatasa se encuentra sobreexpresada. La aromatasa es una enzima clave en la biosíntesis de los estrógenos que cataliza la conversión de androstenediona a estrona y de testosterona a estradiol, lo que provoca que los implantes endometriales estén expuestos a una elevada concentración de estrógenos (Barra *et al.*, 2018).

La resistencia a la progesterona está causada por una reducción general en los receptores de progesterona. La función normal de esta hormona consiste en inducir una respuesta endometrial caracterizada por la inhibición de la proliferación de las células epiteliales (dependiente de estrógenos), la maduración secretora de las glándulas y la transformación de células estromales en células deciduales especializadas (Clemenza *et al.*, 2018).

#### **1.4. TRATAMIENTO DE LA ENDOMETRIOSIS**

El tratamiento de mujeres con endometriosis tiene como objetivo principal la reducción del dolor y la mejora de su calidad de vida, por lo que es esencial un diagnóstico temprano de la enfermedad (Alimi *et al.*, 2018).

La endometriosis se puede abordar de dos formas distintas: mediante cirugía o a través de tratamientos médicos (Vercellini *et al.*, 2013). Aunque la cirugía mejora el dolor asociado a la enfermedad, la calidad de vida y la función sexual, también conlleva ciertos riesgos (complicaciones viscerales, vasculares, neurológicas, etc.). Los procedimientos quirúrgicos tienen una tasa de éxito del 50-80% en la reducción de los síntomas, pero desafortunadamente la endometriosis recurre en un 5-15 % de los casos (Parasar *et al.*, 2017). La terapia médica representa en muchos casos el tratamiento de primera línea, siendo sus objetivos principales la disminución del dolor y la prevención de la recurrencia de la enfermedad después de la cirugía. La elección de la terapia se basa en diversos

factores como la edad, la intensidad y las características del dolor, la preferencia de las pacientes y la presencia de comorbilidades (Barra *et al.*, 2018). Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) constituyen el tratamiento no hormonal de primera línea más común (Zito *et al.*, 2014). Son eficaces en la disminución de la dismenorrea primaria, y su acción se basa en su efecto analgésico y antiinflamatorio. Sin embargo, no hay muchas evidencias que apoyen el uso de AINEs como tratamiento para la endometriosis, ya que pueden ser responsables de efectos adversos significativos (Ferrero *et al.*, 2018 a). Finalmente, las terapias hormonales juegan un papel fundamental y constituyen el tratamiento de elección en muchos casos, existiendo diversos tipos según su modo de acción.

#### **1.4.1. Tratamiento hormonal**

La regulación hormonal es fundamental en el desarrollo de la endometriosis: los implantes endometrióticos presentan una elevada biosíntesis de estradiol y una baja inactivación de dicha hormona en comparación con mujeres sanas. Los estrógenos promueven el crecimiento y la invasión de la lesión endometrial, favoreciendo la aparición del dolor e inflamación. Por ello, los tratamientos hormonales van dirigidos a crear un ambiente hipoestrogénico (agonistas de la GnRH o hiperprogestogénico (progestinas) que reprima la proliferación endometrial mediada por los estrógenos (Vercellini *et al.*, 2013).

##### **Agonistas de la GnRH**

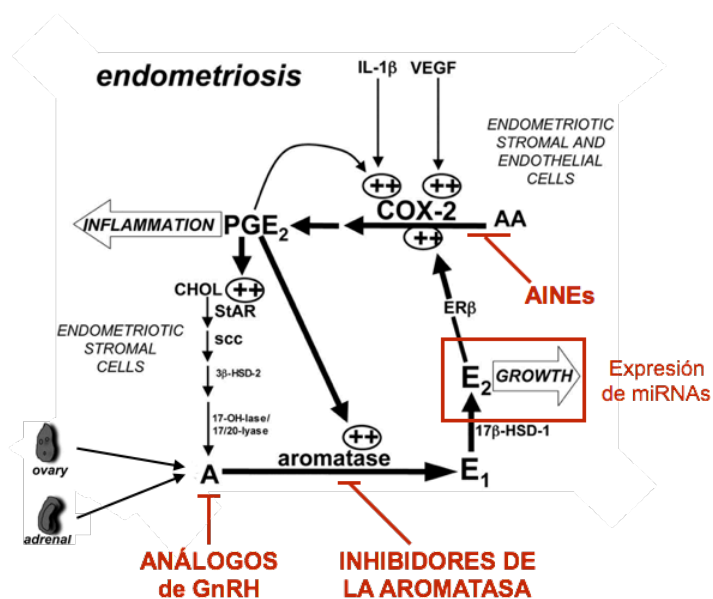
Los análogos de la GnRH suprimen la producción de estrógenos de los ovarios a través de la regulación negativa de los receptores de GnRH a nivel pituitario, produciendo un ambiente hipoestrogénico y como consecuencia amenorrea. Su efecto es reversible, y se consideran un tratamiento de segunda línea (Zito *et al.*, 2014).

##### **Progestinas**

Las progestinas son progestágenos sintéticos cuya acción es similar a la progesterona natural. A través de la actividad anti-gonadotrófica en la glándula pituitaria producen un ambiente sistémico hipoestrogénico e hiperprogestogénico. Recientemente, se ha identificado una actividad antiinflamatoria adicional ejercida directamente sobre las lesiones endometriales (inhibiendo localmente la respuesta inflamatoria y causando apoptosis de las células ectópicas del estroma endometriótico). Se pueden administrar por distintas vías (oral, subdérmica, intramuscular o a través de sistemas intrauterinos) (Barra *et al.*, 2019).

## Inhibidores de la aromatasa

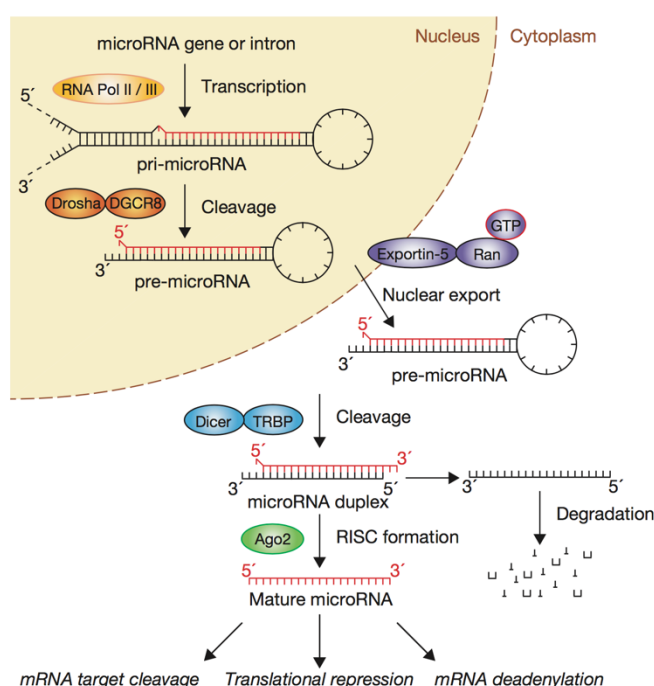
La aromatasa es la enzima que cataliza la conversión de androstenediona y testosterona a estrona y estradiol respectivamente, y se ha demostrado que en los implantes endometrióticos ectópicos y en el endometrio eutópico de mujeres con endometriosis está sobreexpresada (Barra *et al.*, 2018). Los estrógenos producidos por la aromatasa promueven el crecimiento y la invasión de la lesión endometrial, y favorecen la aparición del dolor y la inflamación mediada por prostaglandinas. Por ello, se están investigando los inhibidores de la aromatasa como nuevo tratamiento para la endometriosis: actúan bloqueando la síntesis de estrógenos tanto en la periferia como en los ovarios (Clemenza *et al.*, 2018). En una revisión sistemática, Ferrero *et al.* (2018) examinaron diez ensayos clínicos que investigaban el uso de inhibidores de la aromatasa como tratamiento para la endometriosis, y demostraron que la administración continua de anastrozol y letrozol era eficiente reduciendo la severidad de los síntomas de la endometriosis y mejoraba la calidad de vida de las pacientes. Sin embargo, actualmente hay pocos estudios sobre el efecto de los inhibidores de la aromatasa a largo plazo, y la elevada tasa de efectos adversos limita su administración en la práctica clínica (Ferrero *et al.*, 2018 b).



**Figura 3. Ciclo de retroalimentación positiva en la síntesis de estrógenos y prostaglandinas.** En la figura se indican los puntos de acción de los tratamientos hormonales (análogos de la GnRH e inhibidores de la aromatasa) y no hormonales (AINEs). A = androstenediona, AA = ácido araquidónico, E<sub>1</sub> = estrona, E<sub>2</sub> = estradiol (Figura adaptada de Bulun *et al.*, 2005).

## 1.5. miRNAs

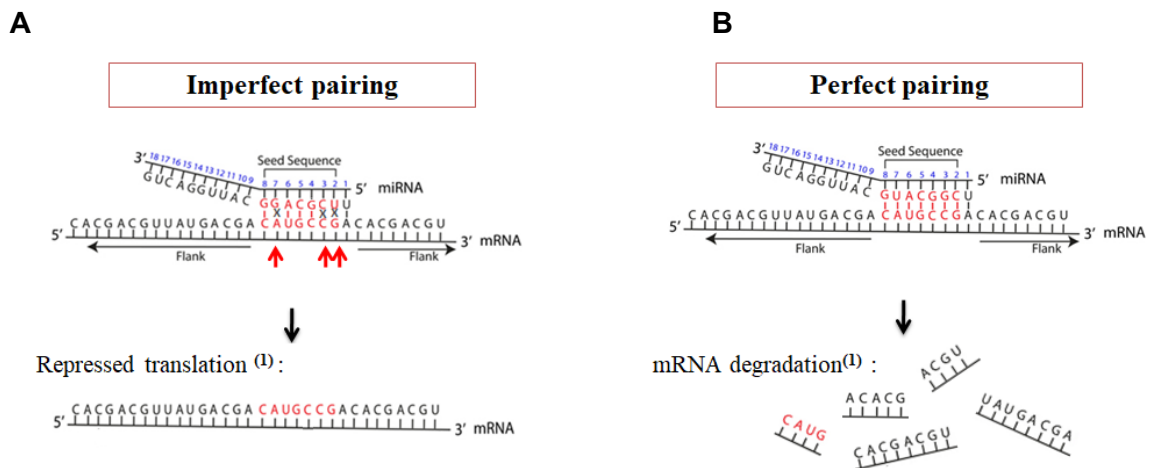
Los microRNAs son pequeñas moléculas de RNA no codificantes (de 19 a 22 nucleótidos) que regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional, y por tanto juegan un papel clave en una gran variedad de procesos biológicos (Bartel *et al.*, 2004). Actúan uniéndose a las regiones 3'UTR de sus mRNas diana, mediando así la represión traduccional y/o la degradación de sus mRNas diana (Marí-Alexandre *et al.*, 2015). Los miRNAs pueden estar codificados en distintas unidades de transcripción, en clústers policistrónicos o en regiones intrónicas de sus genes diana (Panir *et al.*, 2018). Se transcriben en el núcleo por la polimerasa II dando lugar a los miRNAs primarios (pri-miRNAs). Estos son procesados por una RNasa de tipo III denominada Drosha, obteniéndose pre-miRNAs que son exportados al citoplasma por la Exportina 5. Una vez en el citoplasma, los pre-miRNAs son procesados por la endonucleasa Dicer para dar lugar a miRNAs maduros de doble cadena que se asocian con otras proteínas y forman el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC). Este complejo selecciona y facilita la interacción de una de las dos cadenas del miRNA con el RNA mensajero (**Fig. 4**) (Marí-Alexandre *et al.*, 2016 b).



**Figura 4.** Biogénesis de los miRNAs (Winter *et al.*, 2009).

El emparejamiento miRNA:mRNA está definido por la interacción entre la región 3'UTR del mRNA y la denominada “seed sequence”, una región corta de nucleótidos en las posiciones 2-8 del miRNA (Bartel, 2009). Si esta interacción es completa, se produce la

degradación del mRNA, y si la complementariedad es parcial, la traducción del mRNA se inhibe por distintos mecanismos (**Fig. 5**) (Bartel, 2004).



**Figura 5.** Emparejamiento mRNA:miRNA. La interacción entre la región 3'UTR del mRNA y la *seed sequence* del miRNA determina si se produce la represión de la traducción (A) o la degradación del mRNA (B). (Bartel, 2001).

## 1.6. REGULACIÓN HORMONAL DE LOS miRNAs

Los estrógenos pueden regular la transcripción de los miRNAs a través de su interacción con los receptores de estrógeno. Los receptores de estrógeno (ER) forman parte de una súper familia de receptores nucleares, y existen dos subtipos, ER $\alpha$  y ER $\beta$ , codificados por genes separados (ESR1 y ESR2 respectivamente). Actúan como factores de transcripción dependientes de ligando y tienen una elevada afinidad por E<sub>2</sub>. Aunque ambos se expresan en el endometrio, ER $\alpha$  parece ser el principal mediador de la acción estrogénica en este tejido. La expresión de ER $\alpha$  predomina en los tejidos endometriales control y eutópico, mientras que en OMA parece prevalecer ER $\beta$  (Bulun *et al.*, 2010). Tras su activación estrogénica, ER $\alpha$  modula la transcripción de sus genes diana interactuando directamente con secuencias específicas del DNA denominadas elementos de respuesta a estrógenos (EREs), localizadas en los promotores de sus genes diana (Ferraro *et al.*, 2012).

Aunque existen algunos estudios sobre la influencia de los estrógenos en la regulación de ciertos miRNAs en otras patologías también estrógeno-dependientes (cáncer de mama y de endometrio), hay muy poca literatura centrada en el estudio de la influencia de la regulación hormonal de los miRNAs en la fisiopatología de la endometriosis.

## 2. OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo de fin de grado es evaluar la contribución de la regulación por estrógenos de la expresión de miRNAs de interés en cultivos primarios de células estromales de pacientes con endometriosis y mujeres control, así como en una línea celular epitelial.

Como objetivos específicos tenemos los siguientes:

1. Caracterización morfológica de las células de estudio mediante visualización a microscopía electrónica e identificación de los receptores de interés mediante inmunofluorescencia.
2. Evaluación de la expresión del receptor de estrógenos tipo 1 en los distintos cultivos utilizados.
3. Selección de los miRNAs de interés mediante búsqueda bibliográfica.
4. Estimulación de los cultivos con E<sub>2</sub> (epiteliales y estromales) a distintas concentraciones y con vector.
5. Recolección a distintos tiempos (0, 6, 12 y 24 horas) de los cultivos estimulados y sin estímulo hormonal.
6. Determinación de los niveles basales y post-estimulación de los miRNAs de interés.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. SUJETOS DE ESTUDIO**

Las pacientes incluidas en el estudio (n=2) fueron mujeres caucásicas con endometriosis moderada o severa (estadios III-IV) (ASRM, 1996) sometidas a una exploración quirúrgica laparoscópica de la cavidad abdominal, con escisión completa del tejido endometriósico. De cada paciente se obtuvo endometrio eutópico y un fragmento del endometrioma ovárico para la realización de los cultivos primarios.

El tejido endometrial control se obtuvo de mujeres fértiles sin endometriosis (n=2), que fueron sometidas a cirugía para la esterilización tubárica laparoscópica. La ausencia de enfermedad se confirmó por exploración meticulosa del peritoneo, ovarios, intestino y diafragma, confirmando la ausencia de lesiones endometriósicas típicas o atípicas. De cada mujer se obtuvo endometrio control para la realización de los cultivos primarios.

Todas las participantes, tanto pacientes como controles, fueron intervenidas en el Hospital General Universitario de Valencia tras la firma del debido consentimiento informado. La investigación llevada a cabo en este trabajo se realizó siguiendo los principios éticos de la Declaración de Helsinki (1964) (World Medical Association, 2014). Este estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital General Universitario de Valencia (CHGUV).

#### **3.2. CULTIVOS CELULARES**

##### **3.2.1. Cultivo de la línea celular epitelial Ishikawa**

La línea celular Ishikawa (Sigma-Aldrich, Cat. nº 99040201) es una línea celular epitelial humana cuyas células son positivas para ESR1 y PGR.

Para el cultivo de dicha línea celular, se descongeló un criovial conservado en nitrógeno líquido y se resuspendió en medio de cultivo compuesto por MEM (EuroClone, Cat. nº ECB2071L, Italia) suplementado con 10% de FBS (Thermo Fisher Scientific, Cat. nº 10270-098, Brasil) y 2mM Glutamina (Merck, Cat. nº K0282, Alemania). Tras centrifugar dicha suspensión (5', 300 g, RT), se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en el medio mencionado anteriormente. En estas condiciones, se

procedió al cultivo de las células epiteliales en frascos de 75 cm<sup>2</sup> a un volumen final de 15 mL, y se incubaron en una atmósfera humidificada al 5% de CO<sub>2</sub>, a una temperatura de 37 °C. El medio de cultivo se renovó cada 2 días. Cuando la monocapa celular alcanzó el 80% de confluencia, las células se lavaron con PBS y se recolectaron empleando 1 mL de tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich, Cat. nº T4049, EEUU) a 37 °C durante 5'. Tras parar la tripsinización con medio completo, se realizó el recuento celular mediante la cámara de Neubauer y se sembraron las células en dos placas de 24 pocillos, a una densidad de 5·10<sup>4</sup> células/pocillo y volumen de trabajo de 400 µL.

### **3.2.2. Cultivo primario de células estromales**

Para el cultivo primario de células estromales se utilizaron 5 muestras conservadas en N<sub>2</sub> líquido pertenecientes a la colección del grupo de investigación, obtenidas de la forma descrita en Braza-Boils *et al.* (2013). De las 5 muestras, 2 procedían de tejido endometrial control de mujeres sin endometriosis, 2 de tejido endometrial eutópico y 1 de OMA. Se descongelaron dichas muestras y se procedió al cultivo de las mismas en frascos de 25 cm<sup>2</sup>, empleando medio de cultivo compuesto por DMEM (Thermo Fisher Scientific, Cat. nº 21041-025, Reino Unido) suplementado con 10% FBS y 1% Penicilina-Estreptomicina (Sigma-Aldrich, Cat. nº P0781, EEUU). Se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada al 5% de CO<sub>2</sub>, y el medio de cultivo se renovó cada 2 días hasta que la monocapa celular alcanzó el 80% de confluencia. Las células se recolectaron utilizando tripsina-EDTA a 37°C y se sembraron en 2 placas de 24 pocillos por línea celular a una densidad de 5·10<sup>4</sup> células/pocillo para la posterior estimulación hormonal.

### **3.3. ESTIMULACIÓN HORMONAL**

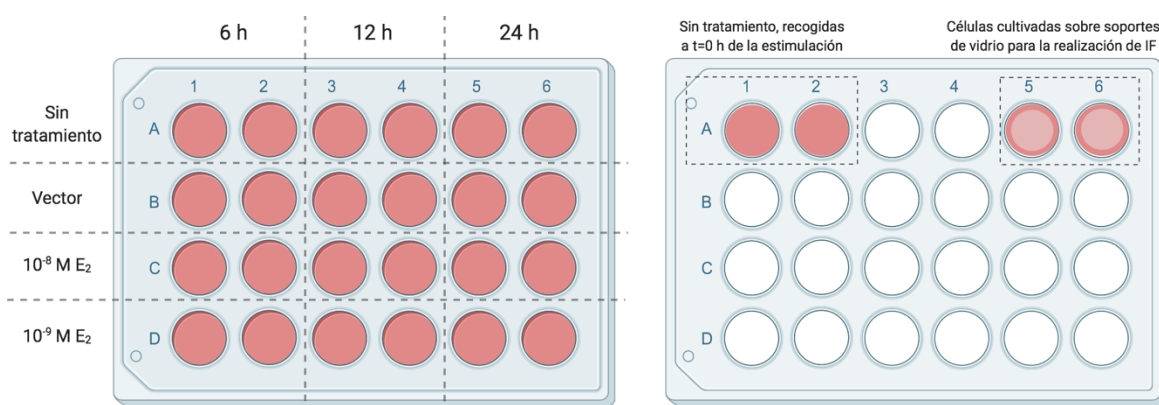
Para estudiar la influencia de 17β-estradiol (E<sub>2</sub>) en la expresión de los miRNAs de estudio, se procedió al tratamiento hormonal tanto de la línea epitelial Ishikawa como de los cultivos primarios estromales.

Previamente a la estimulación se procedió a la preparación de E<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, E2758, Alemania). Para ello se diluyó 1 mg de E<sub>2</sub> en 1 mL de EtOH 100% (20 µg/mL), el cual actúa como vector, y posteriormente se diluyó a 1 µM en DMEM. Los cultivos celulares también fueron tratados con el vector (EtOH 100%) para asegurar que el posible efecto ejercido sobre los miRNAs es debido al E<sub>2</sub> y no al vector.

Las células sembradas en placas de 24 pocillos (90% de confluencia) fueron estimuladas con E<sub>2</sub> (10<sup>-8</sup> y 10<sup>-9</sup> M) y vector diluidos en el correspondiente medio (MEM + 2% FBS + 2 mM Gln para la línea celular epitelial y DMEM + 2% FBS + Penicilina-



Estreptomycin para los cultivos primarios estromales) y se cambió el medio de cultivo a las células no tratadas (**Fig. 6**). Tras la estimulación (0, 6, 12 y 24 horas), las células se lavaron con PBS y se recolectaron empleando 100  $\mu$ L de tripsina-EDTA (5', 37 °C), parando la reacción con 700  $\mu$ L de medio completo (véase en el apartado 3.2). Para conservar las células, se centrifugaron (300 g, 5', 4 °C), se lavaron con PBS y se centrifugaron de nuevo (300 g, 5', 4 °C). Finalmente, el pellet se congeló en N<sub>2</sub>(l) y se guardó a -80 °C hasta la posterior extracción de RNA. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.



**Figura 6.** Plantilla de las placas de 24 pocillos utilizadas para la estimulación hormonal de los cultivos celulares. Dicha plantilla se reprodujo para cada cultivo celular (n=6) estudiado. Se observan los duplicados de cada condición experimental.

### 3.4. ELECCIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE RNA

Para la elección del método de extracción de RNA se realizaron extracciones a partir de 4 alícuotas de un mismo cultivo celular de la línea Ishikawa, dos de ellas utilizando el reactivo TRIzol (Sigma-Aldrich, Cat nº T9424, EEUU) (véase en el apartado 3.5) y dos mediante el kit comercial mirVana<sup>TM</sup> miRNA Isolation kit (Thermo Fisher Scientific, Cat. nº AM156, Lituania), siguiendo en este caso las recomendaciones del fabricante y como previamente aparece descrito en un trabajo del grupo de investigación en el que se ha realizado el presente trabajo (Braza-Boïls *et al.*, 2013). De cada extracción se realizaron duplicados para estudiar la influencia del método de extracción de RNA en la posterior cuantificación de los miRNAs de interés mediante RT-qPCR (apartado 3.8).

### 3.5. EXTRACCIÓN DE RNA

Para realizar la extracción de RNA total (incluyendo la fracción de miRNAs) a partir de los cultivos celulares, se añadieron 100  $\mu$ L de TRIzol al pellet de células congelado a

-80 °C, y tras 1 minuto de vórtex se incubaron en un termobloque (5', 700 rpm, 25 °C) para disociar el complejo de nucleoproteínas. Se añadieron 20 µL de cloroformo (Thermo Fisher Scientific, Cat nº C/4960/15, Reino Unido) para solubilizar los lípidos de la muestra, agitando durante 15" y se incubó de nuevo en un termobloque (3', 700 rpm, 25 °C). Tras la centrifugación (12.000 g, 15', 4 °C) se transfirió la fase superior acuosa, que contenía el RNA, a un ependorf nuevo, y se precipitó con 50 µL de isopropanol (Thermo Fisher Scientific, Cat nº P/7490/21, Reino Unido), incubándose 3' a temperatura ambiente. Tras centrifugar (10', 12.000 g, 4 °C), se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet dos veces con EtOH 75 %. Finalmente, el pellet se dejó secar, se eluyó con 30 µL de H<sub>2</sub>O libre de RNAsas (precalentada a 55 °C) y se incubó a 55 °C durante 15 minutos.

El rendimiento y la pureza del RNA extraído se determinaron utilizando el espectrofotómetro NanoDrop One<sup>C</sup> (Thermo Fisher Scientific, Cat. nº 13-400-519, EEUU).

### **3.6. SELECCIÓN DE LOS miRNAs DE INTERÉS**

Los miRNAs estudiados en este trabajo (miR-99a-5p, let-7c-5p, miR-143-3p, miR-424-5p y miR-29c-3p) fueron seleccionados tras un análisis bibliográfico exhaustivo, tanto de literatura específica sobre la endometriosis (Pan *et al.*, 2007) como de otras patologías ginecológicas estrógeno-dependientes como son el cáncer de mama (Ferraro *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2016; Vivacqua *et al.*, 2019) y el cáncer de endometrio (Kong *et al.*, 2014; Klinge, 2015). Además, para la selección de los miRNAs candidatos a ser regulados por E<sub>2</sub> se consultó la base de datos TransmiR v2.0 (<http://www.cuilab.cn/transmir>). Dicha base de datos contiene un gran número de referencias de miRNAs con elementos de respuesta a distintos factores de transcripción, entre ellos el receptor de estrógenos ESR1.

### **3.7. CUANTIFICACIÓN DEL ESR1 EN LOS CULTIVOS DE ESTUDIO**

#### **3.7.1. RT-PCR**

Para determinar la presencia del receptor ESR1 en los cultivos celulares estudiados se realizó una RT-PCR a tiempo final, utilizando como control de carga el GAPDH. En primer lugar, se realizó una retrotranscripción a partir de 1 µg de RNA total extraído de los cultivos celulares. Para ello se utilizó el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo Fisher Scientific, Cat. nº 4368814, Lituania), empleando el

siguiente mix de reacción: 1 µL de 10 x *RT buffer*, 0.4 µL de 25x dNTPs, 1 µL de 10x *random primers*, 0.5 µL MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 2.1 µL de H<sub>2</sub>O libre de RNAsas y 1 µg de RNA total ( $V_{\text{total}} = 10 \mu\text{L}$ ). La reacción se realizó en el termociclador Eppendorf Mastercycler® X50s (Eppendorf, Cat. nº 6311000010, Alemania), siguiendo el siguiente programa: 10' a 25 °C, 120' a 37 °C, 5' a 85 °C, finalmente conservado a 4 °C. Una vez obtenido el cDNA, se realizó una amplificación mediante PCR a tiempo final utilizando el termociclador Mastercycler® X50s. Para ello, se realizó un mix de reacción conteniendo 7.5 µL Taqman 360 Gold (Thermo Fisher Scientific), 0.6 µL de cada cebador (directo y reverso, ambos a 15 µM), 5.1 µL de H<sub>2</sub>O libre de RNAsas y 1.2 µL del cDNA obtenido en la retrotranscripción, diluido 1:4 en H<sub>2</sub>O libre de RNAsas, y se siguió el siguiente programa: 10' a 95 °C para la activación enzimática, 40 ciclos de: 1' a 95 °C (desnaturalización), 1' a 50 °C (hibridación del cebador) y 1' a 72 °C (extensión de la nueva hebra), manteniéndose finalmente 10' a 72 °C. Las secuencias de los cebadores utilizados pueden observarse en la **tabla 1**. Como control positivo de la PCR se utilizó RNA extraído a partir de células MCF-7 (ATCC® HTB-22™), una línea celular de cáncer de mama que expresa tanto ESR1 como PGR.

**Tabla 1.** Cebadores directos y reversos utilizados en la reacción de RT-PCR para la cuantificación del receptor ESR1 y el control de carga GAPDH.

Proteína	Tipo de cebador	Secuencia 5' — 3'
ESR1	Directo	ATGAGAGCTGCCAACCTTTG
	Reverso	GGTTGGTCAGTAAGCCCATC
GAPDH	Directo	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC
	Reverso	GAAGATGGTGATGGGATTC

### 3.7.2. Detección del amplicón mediante gel de agarosa

Tras la amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% para determinar la presencia del receptor ESR1. Para ello, se pesaron 1.8 g de agarosa (Thermo Fisher Scientific, Cat. nº 10766834, Reino Unido) y se disolvieron en 90 mL de TAE 1X (Thermo Fisher Scientific, Cat. nº B49, Reino Unido). Una vez gelificado se cargaron 5 µL del patrón de peso molecular (con incrementos de 50 pb) y 12 µL de la preparación de la muestra (10 µL del producto de la PCR y 2 µL del tampón de carga 6x).

### 3.7.3. Inmunofluorescencia

Las células cultivadas sobre soportes de vidrio se fijaron con paraformaldehído al 4 % (Merck, Cat. nº 30525-89-4, Reino Unido) durante 10 minutos, y tras su lavado con PBS se permeabilizaron con una solución que contenía PBS + 0,3% Triton X-100 (10 minutos). Para el bloqueo, las células se incubaron en la solución de bloqueo (PBS + 10% FBS) durante 30 minutos a temperatura ambiente. El anticuerpo primario (*Rabbit Monoclonal Anti-Estrogen Receptor Alpha*, Abcam, Cat. nº ab32063) se diluyó 1:500 en la solución de bloqueo + Rhodamina Phalloidina 1:1000 (Abcam, Cat. nº ab235138, Reino Unido) y se incubó *overnight* a 4 °C en un ambiente húmedo. Las células se lavaron con PBS y se incubaron 1 h en oscuridad con el anticuerpo secundario (*Goat Anti-Rabbit IgG H&L*, Alexa Fluor® 488, Abcam, Cat. nº 150077, Reino Unido) diluido 1:1000 en PBS, a temperatura ambiente en un ambiente húmedo. Tras el lavado con PBS, las células se incubaron durante 2' con DAPI diluido 1:1000 en H<sub>2</sub>O desionizada (Abcam, Cat. nº ab228549, Reino Unido) para la tinción de los núcleos, y tras el montaje con el respectivo el medio (Sigma-Aldrich, Cat. nº F4680, EEUU) en un portaobjetos, las células se visualizaron al microscopio de fluorescencia.

Para la caracterización morfológica de los distintos tipos celulares, se realizó la fijación con para formaldehído al 4% durante 10' y, a continuación, se realizó la tinción de los filamentos de actina para la observación del citoplasma mediante 1:1000 (1 h de incubación) y la tinción de los núcleos con DAPI 1:1000 (2' de incubación), realizándose el montaje en un portaobjetos como previamente se ha descrito.

### 3.8. CUANTIFICACIÓN DE miRNAs MEDIANTE RT-qPCR

La cuantificación de los miRNAs de interés se llevó a cabo usando el kit miRCURY™ LNA™ Universal RT microRNA PCR (Qiagen, Alemania). En un primer paso, se realizó una retrotranscripción universal a partir de 10 ng de RNA total empleando el siguiente mix de reacción: 2 µL de 5x miRCURY RT Reaction Buffer, 4.5 µL de H<sub>2</sub>O libre de RNAsas, 1 µL de 10x miRCURY RT Enzyme Mix, 0.5 µL de UniSp6 RNA y 2 µL de muestra de RNA ( $V_{total} = 10 \mu L$ ). La reacción se realizó en el termociclador Mastercycler® X50s. Una vez obtenido el cDNA, se realiza una amplificación a tiempo real mediante PCR con cebadores químicamente modificados (LNA™) en el termociclador LightCycler® 480 II (Roche). Para ello, se realizó una dilución del cDNA 1:60 en H<sub>2</sub>O libre de RNAsas y se añadieron 1.5 µL de esta dilución a un mix de 3.5 µL conteniendo 2.5 µL de miRCURY SYBR Green Master Mix, 0.5 µL PCR primer mix y 0.5 µL de H<sub>2</sub>O

libre de RNAsas. La secuencia de los cebadores utilizados puede observarse en la **tabla 2**.

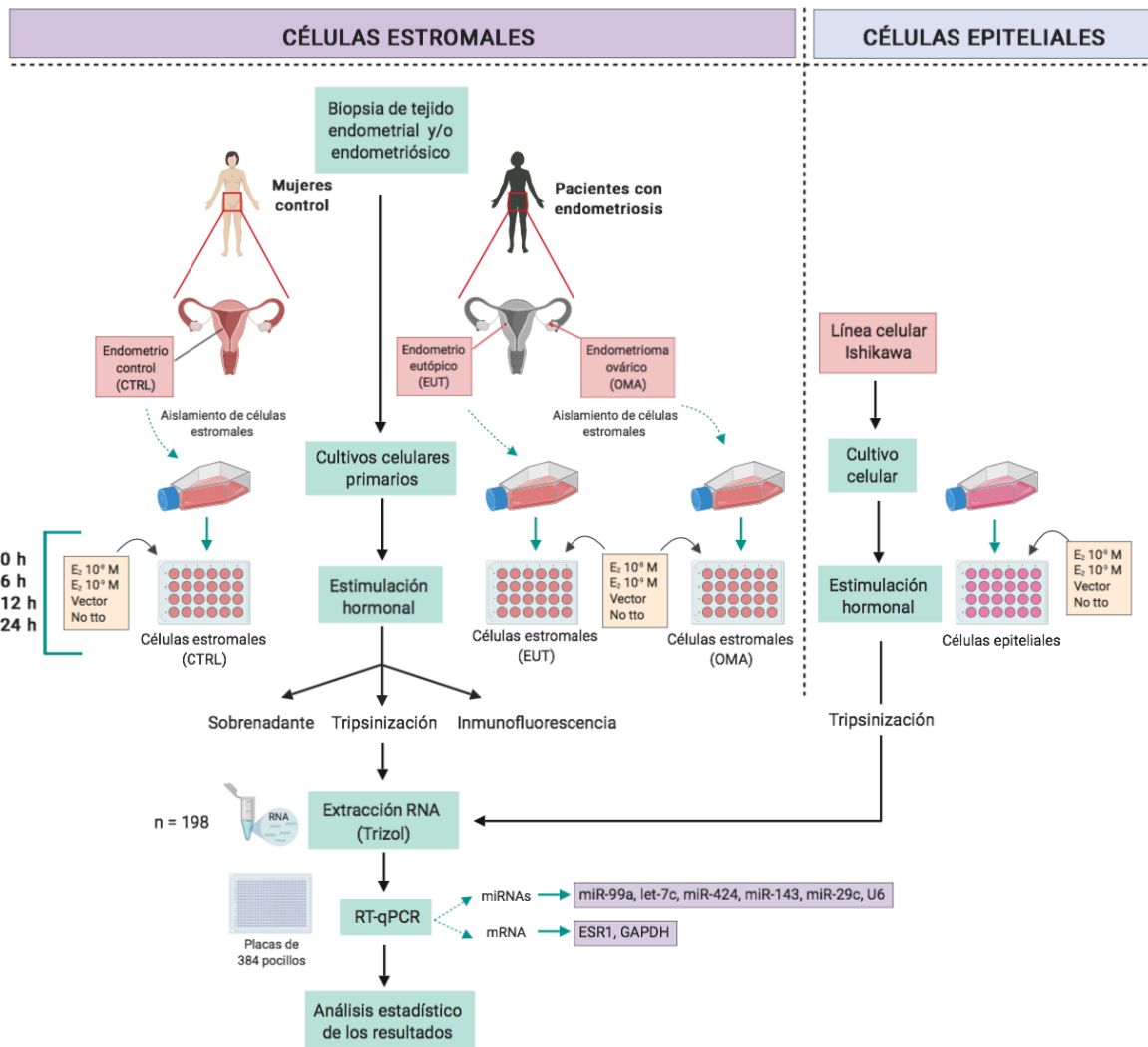
Todas las condiciones experimentales se midieron por cuádruplicado, y los resultados se calcularon mediante la fórmula de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  y se expresan como veces de cambio (media  $\pm$  error típico de la media) respecto al cultivo no tratado.

**Tabla 2.** Cebadores utilizados en la reacción de RT-qPCR para la cuantificación de los miRNAs de estudio (miR-99a-5p, let-7c-5p, miR-143-3p, miR-424-5p y miR-29c-3p). Qiagen, Alemania.

Diana	Secuencia del cebador (5' — 3')	Referencia
miR-99a-5p	AACCCGUAGAUCCGAUCUUGUG	MIMAT0004511
let-7c-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU	MIMAT0000064
miR-143-3p	UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC	MIMAT0000435
miR-424-5p	CAGCAGCAAUUCAUGUUUUGAA	MIMAT0001341
miR-29c-3p	UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA	MIMAT0000681

### 3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de la normalidad de los resultados de la cuantificación de los miRNAs estudiados se empleó el test Kolmogorov-Smirnov. Las diferencias entre las medianas se analizaron mediante el test Kruskal-Wallis. Las diferencias en los niveles de los miRNAs estudiados tras el tratamiento con estrógenos frente al tratamiento con vector se analizaron mediante test no paramétricos para muestras relacionadas. Se consideraron significativos *p valores* < 0,05 (test de dos colas). Los test estadísticos se realizaron usando el software SPSS versión 20 para Windows (SPSS Inc.).

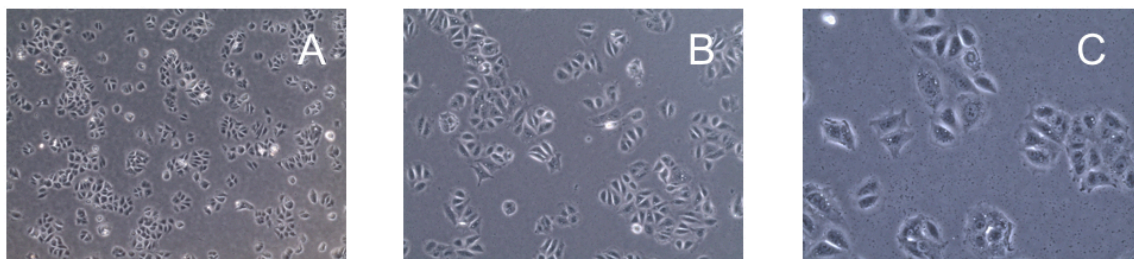


**Figura 7. Diagrama de flujo del procedimiento experimental.** Las biopsias de tejido endometrial de mujeres control y tejido endometriósico de pacientes con endometriosis fueron disgregadas y procesadas en estudios previos por el grupo de investigación en el que se ha realizado el presente trabajo. Las células estromales obtenidas se sembraron primero en frascos T25 y después en placas de 24 pocillos, donde se trataron con diferentes concentraciones de 17 $\beta$ -estradiol ( $10^{-8}$  y  $10^{-9}$  M) y vector (EtOH 100 %). Las células se recogieron a distintos tiempos (0, 6, 12 y 24 h), se extrajo el RNA total empleando TRizol y se realizó una RT-qPCR para analizar la expresión de los microRNAs de estudio (miR-99a-5p, let-7c-5p, miR-143-3p, miR-424-5p y miR-29c-3p). Finalmente, se procedió a realizar un análisis estadístico de los resultados. Para las células epiteliales de la línea celular Ishikawa se realizó el mismo procedimiento.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS CULTIVOS

#### 4.1.1. Línea celular Ishikawa

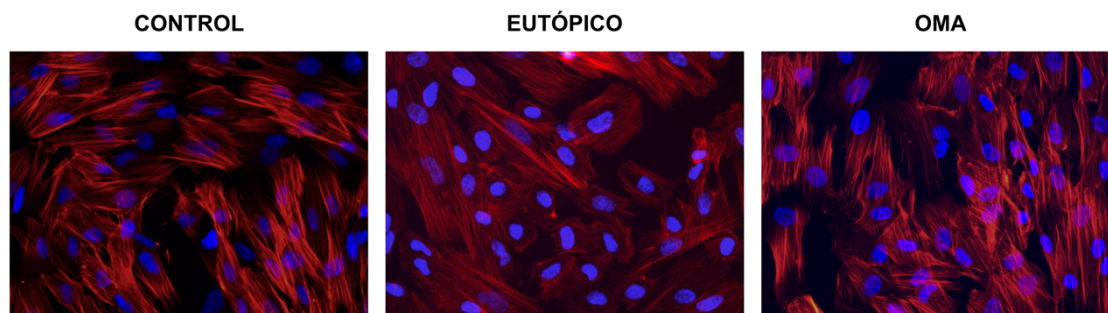


**Figura 8.** Células epiteliales de la línea celular Ishikawa obtenidas mediante microscopía óptica a distintos aumentos: (A) 4x, (B) 10x, (C) 20x.

Las células epiteliales de la línea celular Ishikawa presentan la morfología típica de las células epiteliales, con una forma poligonal, regular y poco alargada, y un núcleo prominente y en una posición central (**Fig. 8**). Inicialmente crecen agrupadas en islas, para posteriormente formar una monocapa. Al tratarse de una línea celular establecida su comportamiento es muy homogéneo.

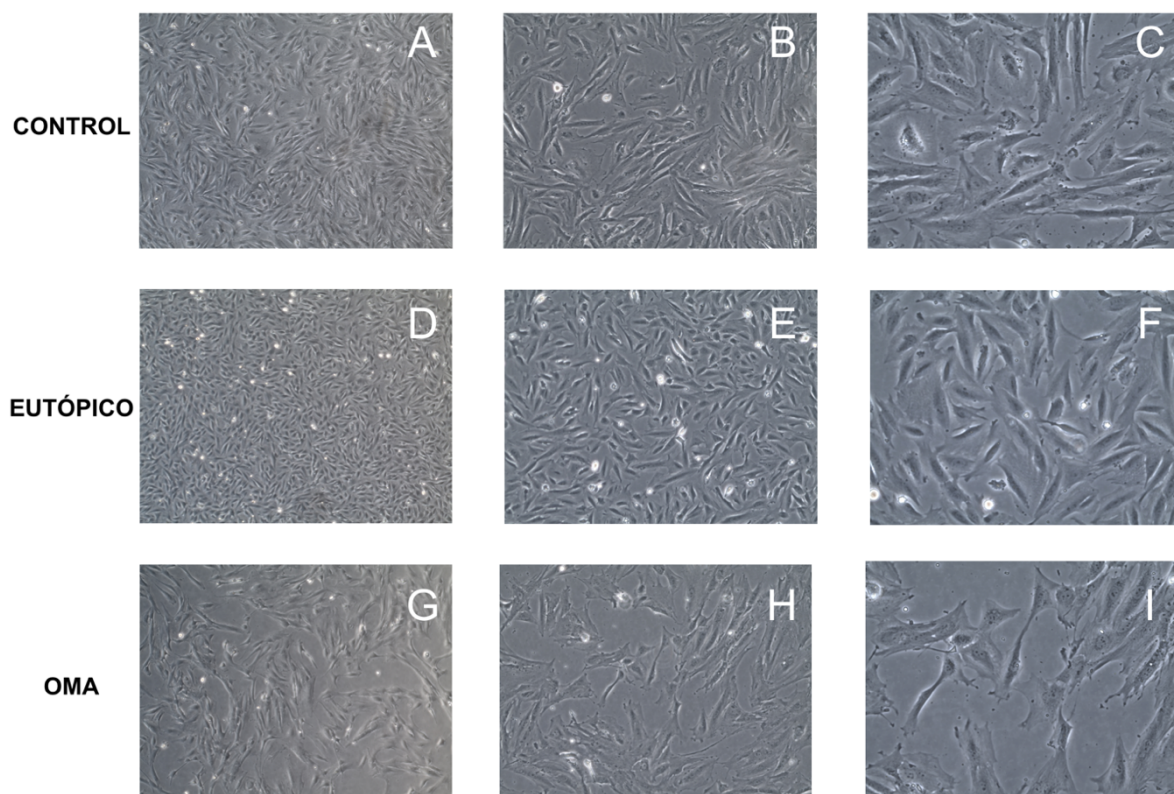
#### 4.1.2. Cultivos primarios de células estromales

De forma claramente diferenciada a las células epiteliales Ishikawa, los cultivos primarios de células estromales presentan una morfología alargada de tipo fusiforme. Pueden observarse células procedentes de todos los tipos estudiados: las células estromales del endometrio control (**Fig. 10. A, B y C**), eutópico (**Fig. 10. D, E y F**) y procedentes del endometrioma ovárico (**Fig. 10. G, H e I**).



**Figura 9.** Tinción fluorescente con Rhodamina-Phalloidina para observar el citoplasma (en color rojo) y DAPI para el núcleo (en color azul) de células estromales procedentes de cultivos primarios de endometrio control, eutópico y OMA, visualizados al microscopio de fluorescencia a un aumento de 40x.





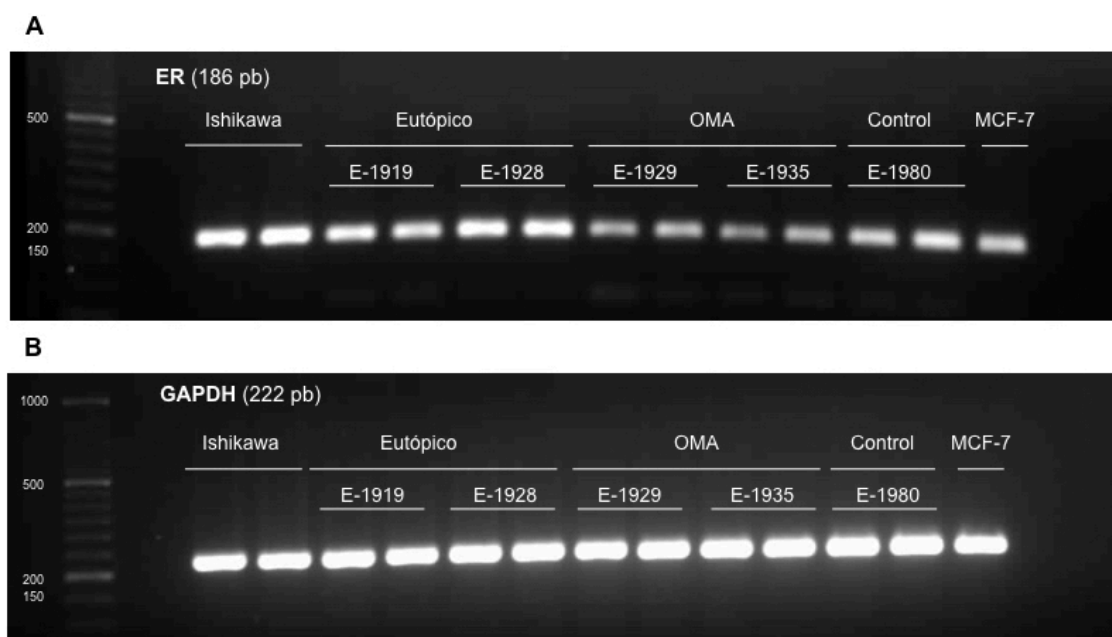
**Figura 10.** Células estromales procedentes de tejido endometrial control de mujeres sanas (A, B, C), tejido endometrial eutópico (D, E, F) y endometrioma ovárico de pacientes con endometriosis (G, H, I), mediante microscopía electrónica, empleando distintos aumentos (5x, 10x y 20x respectivamente).

## 4.2. ANÁLISIS DEL RECEPTOR ER $\alpha$

### 4.2.1. Análisis de la transcripción del gen ESR1 mediante RT-PCR

Previamente a la realización de los tratamientos hormonales, se determinó la presencia del receptor de estrógenos (ESR1) en los distintos cultivos celulares mediante la técnica de RT-PCR a tiempo final con cebadores específicos, utilizando como control positivo RNA extraído a partir de células MCF-7, una línea celular de cáncer de mama que expresa tanto ESR1 como PGR. Como se puede observar (**Fig. 11. A**), todos los tipos celulares expresan el receptor de estrógenos tipo 1. Sin embargo, las células estromales procedentes de endometriomas ováricos presentan una expresión atenuada de ESR1 con respecto a los otros tipos celulares. La cuantificación de GAPDH como control de carga en estas células permite descartar que la menor expresión de ESR1 sea debida a un artefacto experimental (**Fig. 11. B**).

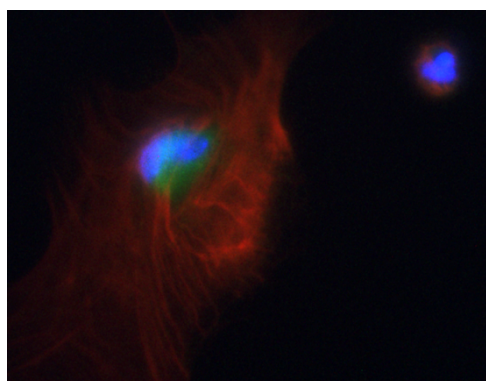




**Figura 11.** Cuantificación mediante RT-PCR a tiempo final del receptor de estrógenos ESR1 (A) y GAPDH (B) a partir de RNA extraído de cultivos celulares epiteliales (línea celular Ishikawa) y cultivos primarios estromales de endometrio eutópico de pacientes (E-1919 y E-1928), endometrioma ovárico (E-1929 y E-1935) y endometrio control de mujeres sin endometriosis (E-1980). Como control positivo se utilizó RNA extraído de la línea celular de cáncer de mama MCF-7.

#### 4.2.2. Análisis de la expresión proteica de ER $\alpha$ mediante inmunofluorescencia

Para tratar de demostrar que ER $\alpha$  está presente en las células estudiadas, se realizó la técnica de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo monoclonal anti-ER $\alpha$  humano y un anticuerpo secundario ligado a un fluoróforo para la detección de la expresión del receptor. Puede observarse la localización de ER $\alpha$  (verde) en una línea de cultivo primario estromal procedente de endometrio eutópico de una paciente con endometriosis. La tinción con DAPI (azul) permite observar la localización nuclear de este receptor, tal y como se esperaba.

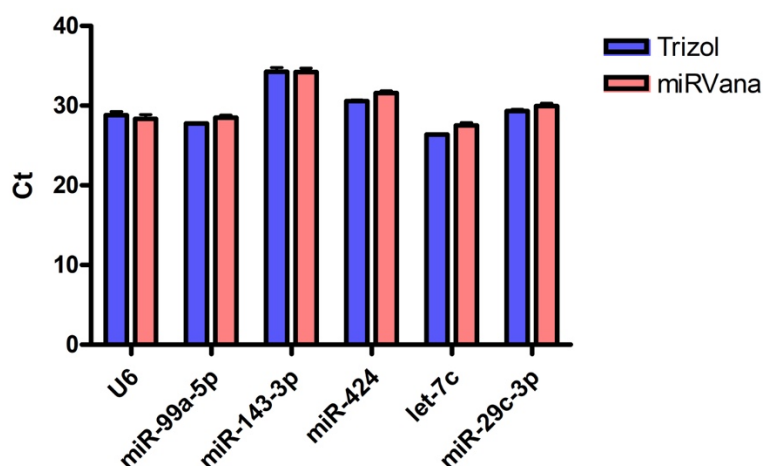


**Figura 12.** Inmunofluorescencia de una célula estromal procedente de endometrio eutópico de una paciente con endometriosis. El citoplasma puede observarse en rojo (tinción con Rhodamina-Phalloidina), el núcleo en azul (DAPI) y la expresión de ER $\alpha$  en el núcleo se visualiza en color verde (Anticuerpo monoclonal anti-ER $\alpha$ ). Visualización a través de un microscopio de fluorescencia, aumento 40x.

#### 4.3. INFLUENCIA DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE RNA EN LA CUANTIFICACIÓN DE miRNAs POR RT-qPCR

Debido a la controversia existente acerca del posible sesgo que puede causar la extracción de RNA por TRIzol en el aislamiento de los miRNAs, se realizaron dos extracciones mediante esta técnica y otras dos empleando el kit de extracción mirVana a partir de alícuotas idénticas de cultivo celular de la línea Ishikawa.

Como puede observarse (**Fig. 13**), los resultados indican que el método de extracción empleado no influye en la posterior cuantificación de los miRNAs, por lo que se decidió utilizar el reactivo TRIzol para el resto de las extracciones, debido a su mayor viabilidad económica.



**Figura 13.** Comparación entre el método de extracción de RNA del reactivo TRIzol y del kit mirVana en la cuantificación de los niveles de expresión de los miRNAs de interés mediante RT-qPCR.

#### 4.4. DETERMINACIÓN DEL NORMALIZADOR PARA LOS ESTUDIOS DE miRNA

Antes de proceder al análisis estadístico de los resultados, se procedió a comprobar que el U6 snRNA era un normalizador válido en nuestras condiciones experimentales. Para ello, se analizaron los datos crudos (Ct) de las mediciones realizadas de todos los miRNAs estudiados en cada cultivo mediante el software de libre acceso RefFinder (<https://www.heartcure.com.au/for-researchers/>) (Xie *et al.*, 2012). Este software presenta la ventaja de integrar distintos métodos para el análisis del mejor normalizador (delta-CT, BestKeeper, NormFinder y geNorm), dando como resultado un ranking

recomendado. En nuestro caso, los resultados ordenados de mayor a menor estabilidad se muestran en la **tabla 3**. Puede observarse que en ningún cultivo celular el U6 snRNA es el normalizador recomendado. Por lo tanto, a raíz de ello, eligió el microRNA let-7c en lugar del U6 snRNA para la normalización de los resultados.

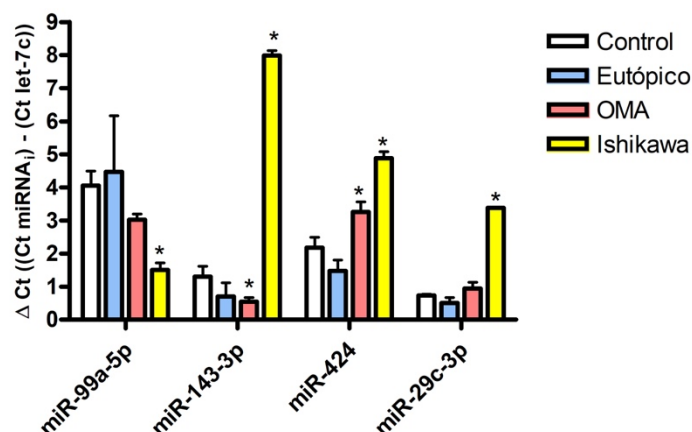
**Tabla 3.** Estabilidad de los distintos normalizadores en cada cultivo celular estudiado.

Muestra	Normalizadores por orden de estabilidad (de mayor a menor)					
	1	2	3	4	5	6
E-1980	<b>let-7c</b>	U6 snRNA	miR-29c-3p	miR-424	miR-99a-5p	miR-143-3p
E-1924	miR-29c-3p	miR-424	<b>let-7c</b>	miR-143-3p	U6 snRNA	miR-99a-5p
E-1919	miR-29c-3p	<b>let-7c</b>	miR-424	U6 snRNA	miR-99a-5p	miR-143-3p
E-1971	miR-29c-3p	miR-424	<b>let-7c</b>	U6 snRNA	miR-99a-5p	miR-143-3p
E-1935	<b>let-7c</b>	miR-424	U6 snRNA	miR-29c-3p	miR-99a-5p	miR-143-3p
Ishikawa	<b>let-7c</b>	miR-99a-5p	miR-29c-3p	U6 snRNA	miR-143-3p	miR-424

#### 4.5. EXPRESIÓN BASAL DE LOS miRNAs DE INTERÉS EN LOS DISTINTOS TIPOS CELULARES

Antes de proceder a la estimulación hormonal, determinamos la expresión basal de los miRNAs de interés (miR-99a-5p, miR-143-3p, miR-424, miR-29c-3p) en los distintos tipos celulares. Como puede observarse (**Fig. 14**), en los tres tipos de cultivos primarios estromales (control, eutópico y OMA) cada miRNA mantiene unos niveles de expresión similares, a excepción del miR-143-3p y miR-424 en OMA vs. control, que se encuentran estadísticamente disminuidos y aumentados frente al cultivo de endometrio control, respectivamente ( $\Delta Ct$  miR-143-3p:  $0.54 \pm 0.13$  vs.  $1.30 \pm 0.32$  cultivo estromal OMA vs. cultivo estromal control,  $p < 0.05$ ;  $\Delta Ct$  miR-424:  $3.26 \pm 0.30$  vs.  $2.18 \pm 0.31$ , cultivo estromal OMA vs. cultivo estromal control,  $p < 0.05$ ).

No obstante, la expresión de todos los miRNAs de estudio difiere significativamente en la línea celular epitelial Ishikawa, siendo menor en miR-99a-5p y mayor en miR-143-3p, miR-424 y miR-29c-3p ( $\Delta Ct$  miR-99a-5p:  $1.50 \pm 0.22$  vs.  $4.05 \pm 0.44$ , Ishikawa vs. cultivo estromal control,  $p < 0.05$ ;  $\Delta Ct$  miR-143-3p:  $7.98 \pm 0.15$  vs.  $1.30 \pm 0.32$ , Ishikawa vs. cultivo estromal control,  $p < 0.05$ ;  $\Delta Ct$  miR-424-5p:  $4.89 \pm 0.19$  vs.  $2.18 \pm 0.31$ , Ishikawa vs. cultivo estromal control,  $p < 0.05$ ;  $\Delta Ct$  miR-29c-3p:  $3.38 \pm 0.02$  vs.  $0.73 \pm 0.04$ , Ishikawa vs. cultivo estromal control,  $p < 0.05$ ). (**Fig. 14**)



**Figura 14.** Resultados de la cuantificación basal de los miRNAs de interés (miR-99a-5p, 143-3p, 424 y 29c-3p) expresados mediante  $\Delta Ct$  frente al normalizador let-7c. \* $p < 0,05$  en cualquier grupo vs. Cultivo estromal endometrio control (Prueba U de Mann-Whitney).

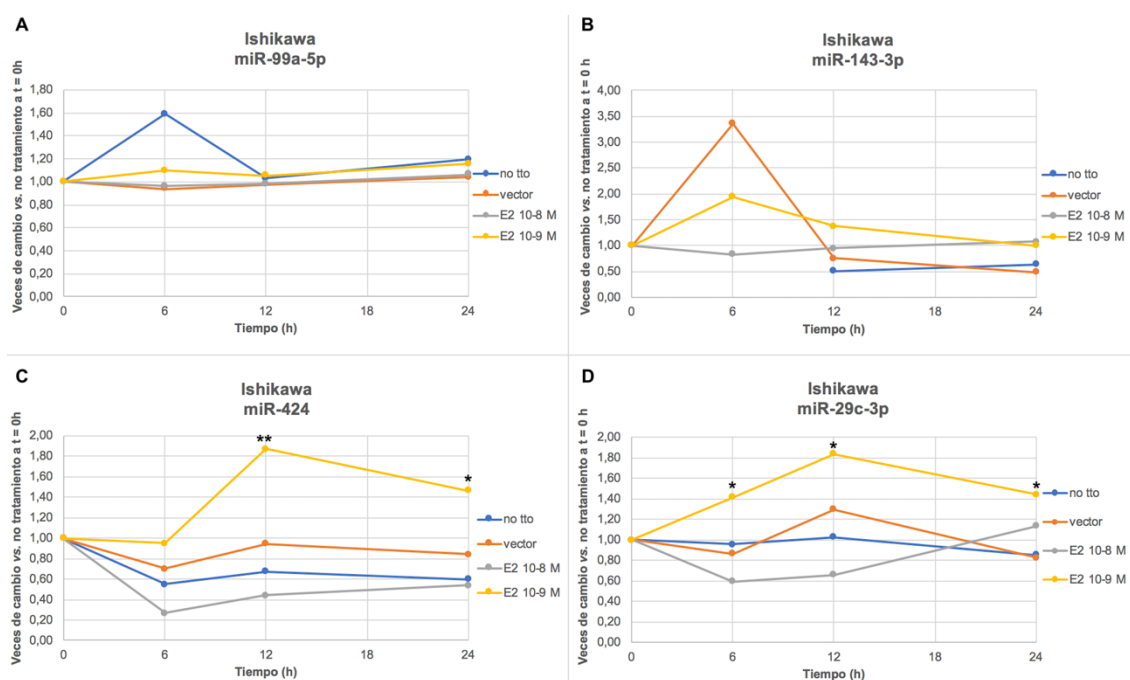
#### 4.6. CUANTIFICACIÓN DE LOS miRNAs EN LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS MEDIANTE RT-qPCR

Con el objetivo de evaluar la influencia de la hormona ovárica  $E_2$  en la expresión de miRNAs en cultivos primarios estromales y la línea celular epitelial Ishikawa, se realizaron tratamientos a dosis crecientes de  $E_2$  ( $10^{-9}$  M y  $10^{-8}$  M). Debido a que el reactivo empleado debe disolverse en etanol, se realizaron tratamientos solamente con vector y se comparó con los pocillos no tratados. En todas las condiciones se sembraron las células por duplicado y de cada pocillo se realizaron duplicados de la PCR para cada miRNA de interés. Cabe decir que, aunque no se representan las barras de error en los gráficos para facilitar la visualización de los resultados, los datos están disponibles en la **tabla suplementaria 1**.

En la línea celular epitelial Ishikawa puede observarse que independientemente de la dosis empleada, el tratamiento con  $E_2$  no influye en la expresión de los miRNAs miR-99a-5p i miR-143-3p (**Fig. 15 A y B**, respectivamente). No obstante, puede observarse para el miR-424 que el tratamiento con  $E_2$   $10^{-9}$  M produce un aumento máximo y estadísticamente significativo para la expresión de este miRNA a las 12 h en relación al tratamiento con vector ( $1,87 \pm 0,17$  vs.  $0.95 \pm 0.19$ ;  $p < 0.01$ ), cuyo efecto decae a las 24 h del tratamiento, aunque sigue estando aumentado significativamente frente al tratamiento con vector ( $1,47 \pm 0.06$  vs.  $0.84 \pm 0.10$ ;  $p < 0.05$ ). Sorprendentemente, el tratamiento con una mayor dosis de  $E_2$ , aunque no de forma significativa, produce una

disminución de la expresión del miRNA a las 6 h, que se recupera completamente a las 24h en comparación con los cultivos no tratados (**Fig. 15 C**).

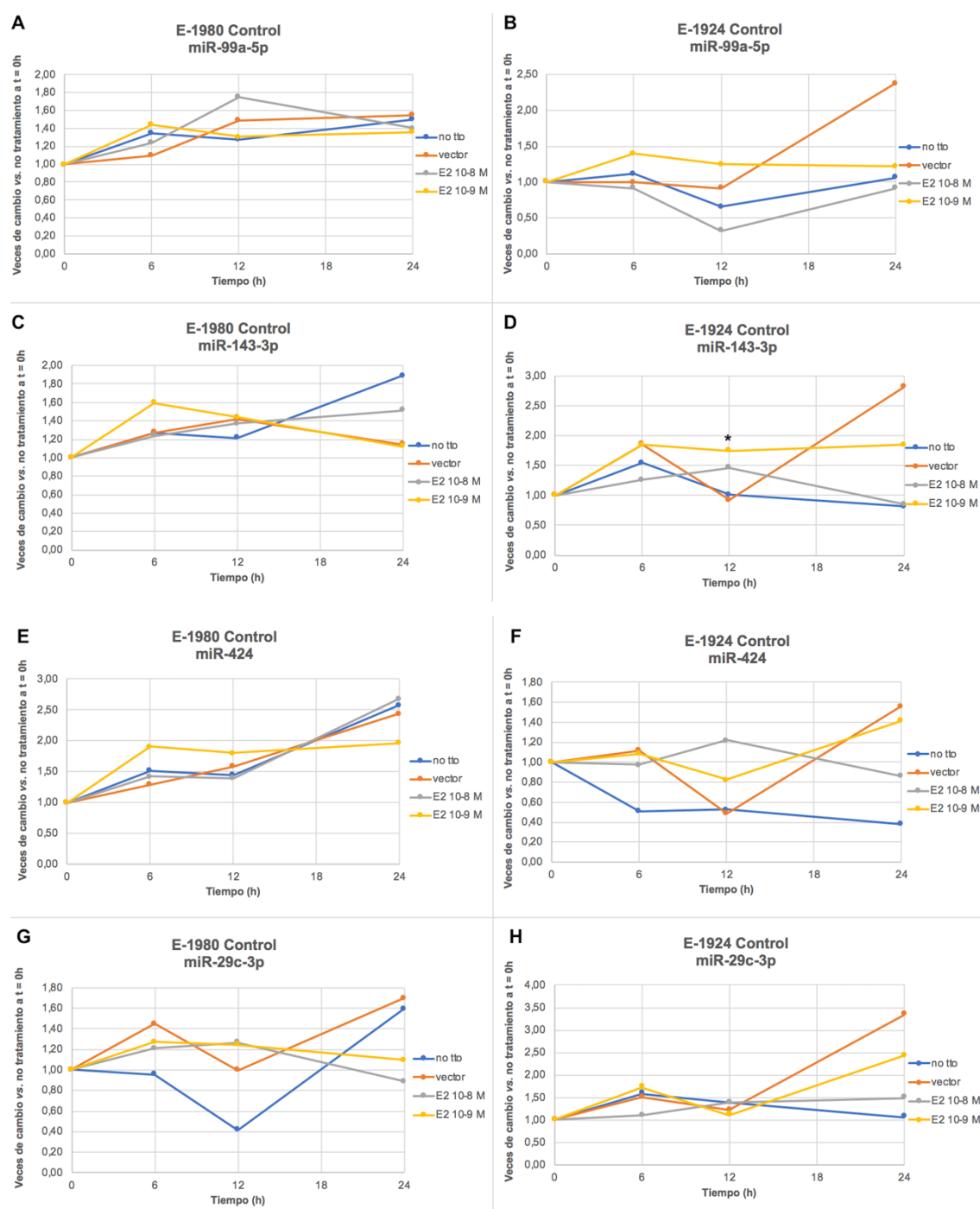
Finalmente, podemos observar cómo el tratamiento con E<sub>2</sub> a una dosis de 10<sup>-9</sup> M produce también un aumento máximo y estadísticamente significativo para la expresión del miRNA miR-29c-3p a las 12 h en relación al tratamiento con vector (1,84 ± 0.14 vs. 1,30 ± 0.10; p <0.05), cuyo efecto también decae a las 24 h del tratamiento (1,45 ± 0,05 vs. 0,83 ± 0,13; p <0.05) (**Fig. 15 D**). Sin embargo, a diferencia de lo observado para el miR-424, existe un aumento gradual de 6 h a 12 h, estando los niveles de expresión a las 6 h también significativamente aumentados en relación con el tratamiento con vector (1,41 ± 0,06 vs. 0,87 ± 0,04; p <0.05). De igual forma que para el miR-424, resulta sorprendentemente que el tratamiento con una mayor dosis de E<sub>2</sub>, aunque no de forma significativa, produce una disminución de la expresión del miRNA a las 6 h, que se recupera progresivamente hasta las 24 h en comparación con los cultivos no tratados.



**Figura 15.** Resultados de la cuantificación de los microRNAs miR-99a-5p (A), miR-143-5p (B), miR-424 (C) y miR-29c-3p (D) en la línea epitelial Ishikawa tras los distintos tratamientos. Los resultados se presentan como la media de cuadruplicados. \* p<0,05; \*\* p<0,01.

De igual modo, se evaluó si la estimulación hormonal con E<sub>2</sub> era capaz de modificar la expresión de los miRNAs de interés en cultivos primarios estromales procedentes de endometrio control de mujeres sin endometriosis y endometrio eutópico y endometriomas ováricos de pacientes con endometriosis.

En el endometrio control (**Fig. 16**), puede observarse que el tratamiento con E<sub>2</sub>, independientemente de la dosis, no es capaz de modificar la expresión de los miRNAs de interés.



**Figura 16.** Resultados de la cuantificación de los microRNAs estudiados en dos cultivos primarios estromales procedentes de endometrios control diferentes (E-1980 y E-1924) tras los distintos tratamientos: miR-99a-5p (A, B), miR-143-5p (C, D), miR-424 (E, F) y miR-29c-3p (G, H). Los resultados se presentan como la media de cuadruplicados. \* p<0,05.

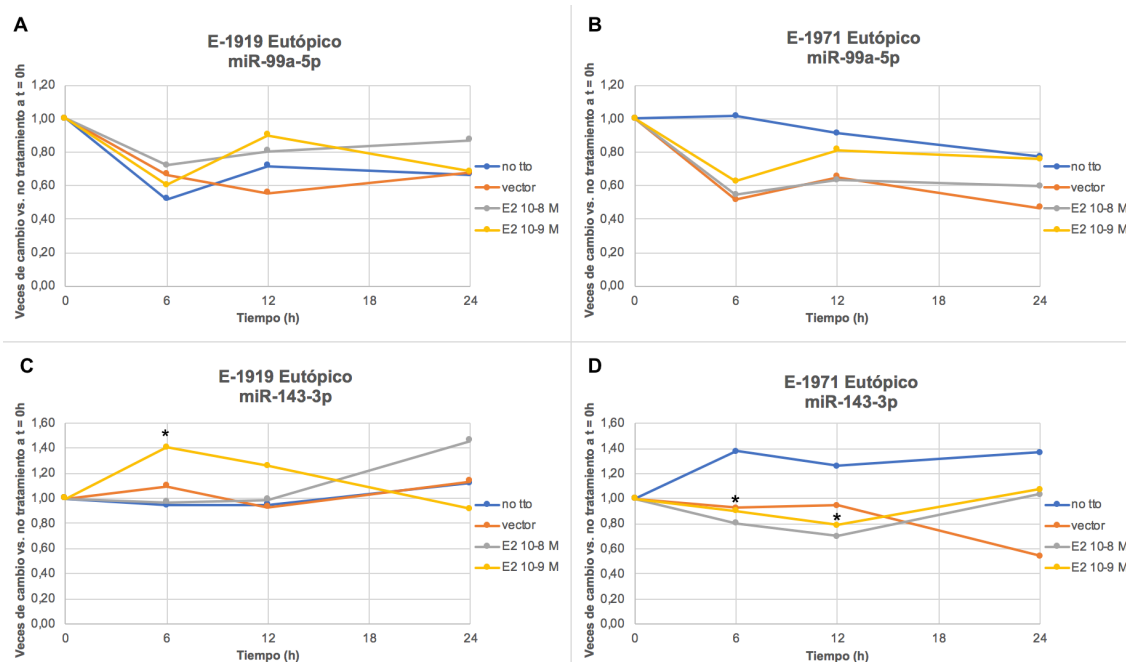
Únicamente en el cultivo E-1924 se observa un aumento en la expresión del miR-143-3p a las 12 h tras el tratamiento con E<sub>2</sub>, que es significativo para una dosis de 10<sup>-9</sup> M

( $1.75 \pm 0.28$  vs.  $0.92 \pm 0.13$ ;  $p < 0.05$ ). De forma sorprendente, el tratamiento con  $E_2$  a una dosis 10 veces mayor ( $10^{-8}$  M) produce un aumento a las 12 h, pero de menor magnitud y que no alcanza la significación estadística ( $1.46 \pm 0.08$  vs.  $0.92 \pm 0.13$ ; NS). Finalmente, cabe destacar un aumento a las 24 h tras el tratamiento solamente con vector (**Fig. 16 D**).

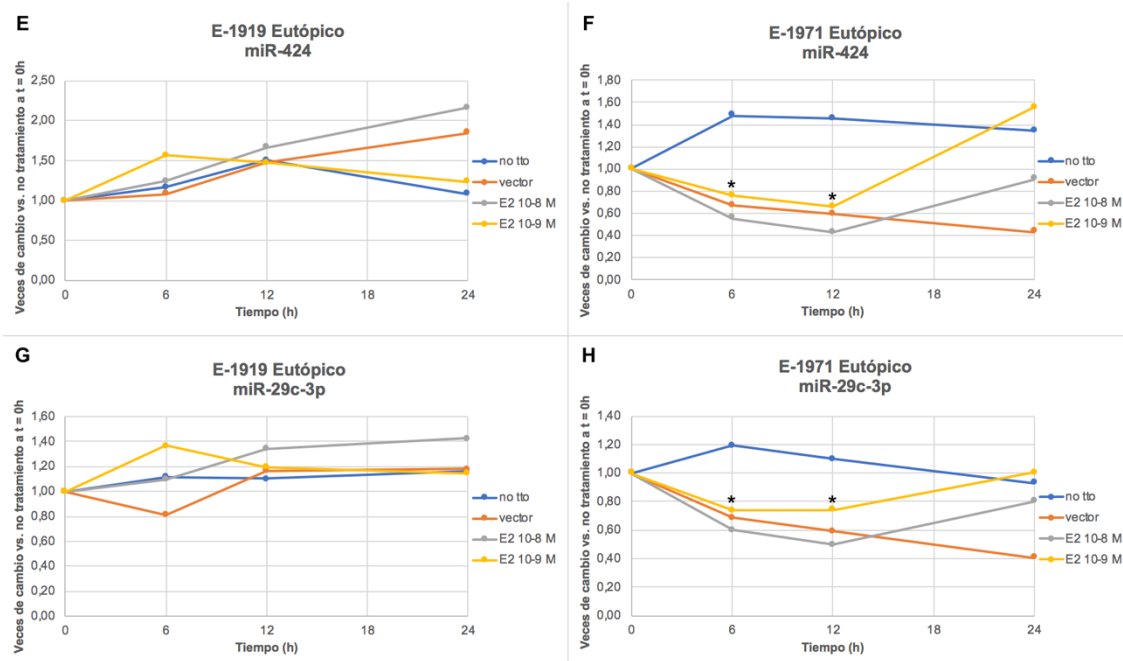
Debido a su distinto comportamiento, cabe mencionar la respuesta de cada cultivo estromal de endometrio eutópico de forma individual.

En uno de los cultivos, (E-1919, **Fig. 17 A, C, E, G**) se observa un aumento significativo en la expresión del miR-143-3p a las 6 h tras el tratamiento con  $E_2$   $10^{-9}$  M en comparación con el tratamiento con vector (**Fig. 17 C**) ( $1.41 \pm 0.11$  vs.  $1.10 \pm 0.05$ ;  $p < 0.05$ ), decayendo este aumento de la expresión a lo largo de los siguientes tiempos. Cabe destacar que, al igual que ocurría con la línea Ishikawa y los cultivos de endometrio control, el efecto es mayor para dosis de  $E_2$   $10^{-9}$  M que para  $10^{-8}$  M.

Por otro lado, cabe destacar que el otro cultivo de endometrio eutópico (E-1971, **Fig. 17 B, D, F, H**) presenta un comportamiento distinto en cuanto a la respuesta en la expresión de miRNAs a la estimulación hormonal. Como puede observarse, el tratamiento con vector,  $E_2$   $10^{-9}$  M y  $10^{-8}$  M disminuye significativamente ( $p < 0.05$ ) y en igual medida los niveles de miR-143-3p, miR-424 y miR-29c-3p a las 6 y 12 h frente al cultivo no tratado (**Fig. 17 D, F, H, respectivamente**).

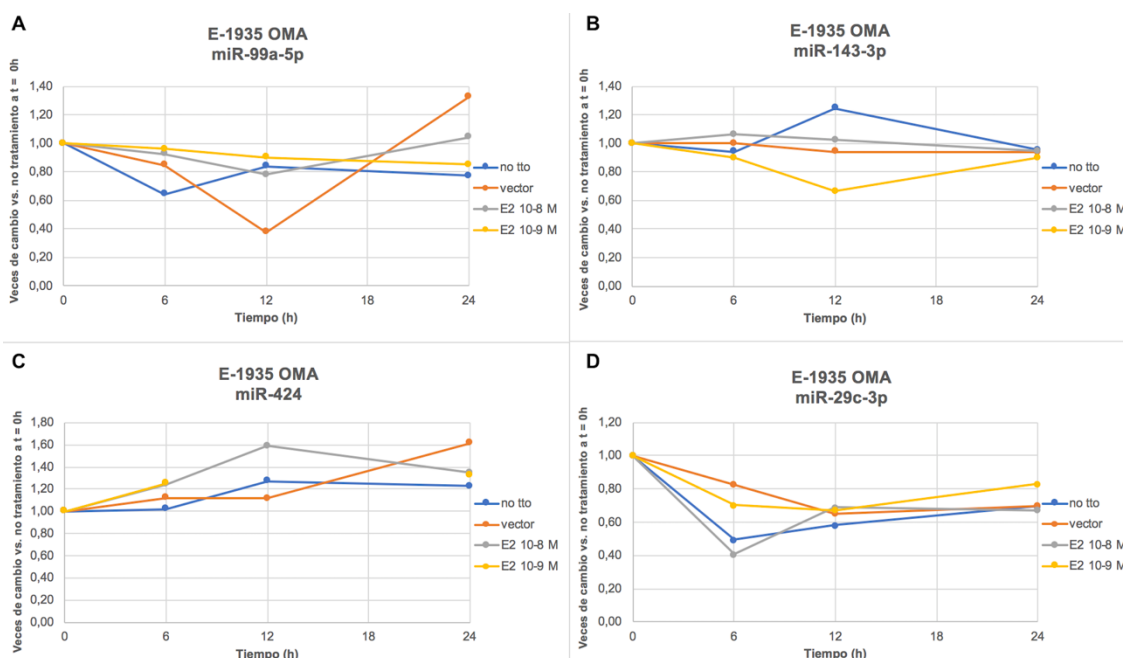






**Figura 17.** Resultados de la cuantificación de los microRNAs estudiados en dos cultivos primarios estromales procedentes de endometrio eutópico de pacientes con endometriosis (E-1919 y E-1971) tras los distintos tratamientos: miR-99a-5p (A, B), miR-143-5p (C, D), miR-424 (E, F) y miR-29c-3p (G, H). Los resultados se presentan como la media de cuadruplicados. \*  $p < 0,05$ .

Finalmente, no existe ninguna variación significativa en la expresión de los miRNAs de estudio tras el tratamiento con ninguna de las dosis de  $E_2$  en los cultivos de endometrioma ovárico (Fig. 18 A – 18 D).



**Figura 18.** Resultados de la cuantificación de los microRNAs miR-99a-5p (A), miR-143-5p (B), miR-424 (C) y miR-29c-3p (D) en un cultivo primario estromal procedente de un endometrioma ovárico de una paciente con endometriosis (E-1935) tras los distintos tratamientos. Los resultados se presentan como la media de cuadruplicados. No existen variaciones significativas en la expresión de los miRNAs de estudio.



## 5. DISCUSIÓN

La endometriosis es una enfermedad estrógeno-dependiente y resistente a la progesterona cuyo mecanismo etiopatogénico exacto aún se desconoce (Parasar *et al.*, 2017). Diversos estudios han demostrado que los microRNAs están implicados en su fisiopatología a distintos niveles: en la angiogénesis (Caporali *et al.*, 2011; Ramón *et al.*, 2011; Braza-Boïls *et al.*, 2014; Marí-Alexandre *et al.*, 2015), en el remodelado de la matriz extracelular (Gilabert-Estellés *et al.*, 2003; Ohlsson-Teague *et al.*, 2009; Giudice, 2010; Braza-Boïls *et al.*, 2014; Marí-Alexandre *et al.*, 2015), en la proliferación (Ohlsson-Teague *et al.*, 2009; Gilabert-Estellés *et al.*, 2012), en la supervivencia celular (Ohlsson-Teague *et al.*, 2009; Filigheddu *et al.*, 2010; Giudice, 2010), etc.

En el presente estudio se ha comprobado que ER $\alpha$  se expresa en todos los cultivos celulares de estudio, siendo menor su expresión en el cultivo primario de células estromales procedentes de OMA. También se ha demostrado la validez de la técnica TRIzol para la extracción de RNA y se ha probado que el microRNA let-7c es un mejor normalizador que U6 snRNA en los experimentos realizados. Finalmente, se ha observado que tras el tratamiento con menor dosis de estradiol ( $10^{-9}$  M), los miR-424-5p y miR-29c-3p aumentan en la línea celular epitelial Ishikawa y el miR-143-3p en los cultivos de células estromales procedentes de endometrio control y eutópico.

Como paso previo al estudio de la regulación de la expresión de miRNAs mediante el tratamiento con estrógenos, se ha cuantificado la expresión del receptor ESR1 en los cultivos de interés. Los resultados normalizados frente a GAPDH muestran que este gen se expresa abundantemente en cultivos estromales de endometrio control, endometrio eutópico y en la línea epitelial Ishikawa, siendo su expresión menor en cultivos estromales de endometrioma ovárico. Estos resultados están en concordancia con resultados recientes obtenidos en tejidos por otros autores (Maekawa *et al.*, 2019), y permiten demostrar que la expresión de este receptor se conserva en cultivos primarios, posibilitando la realización de los experimentos de estimulación hormonal inicialmente planteados.

En cuanto al método de extracción de RNA, existe una creciente controversia sobre si la técnica de TRIzol puede introducir un sesgo en la extracción de los miRNAs según su secuencia de nucleótidos. Algunos autores (Kim *et al.*, 2012) apuntan que pequeños RNAs con un bajo contenido en GC se recuperan de forma ineficiente cuando se utiliza

un número pequeño de células para el aislamiento de RNA con TRIzol. En nuestro caso, los análisis realizados (**Fig. 13**) demuestran que no existe ningún sesgo en la extracción de los miRNAs de interés. Una posible explicación para este hallazgo es el contenido medio en GC de los miRNAs estudiados (**Tabla suplementaria 2**). Por ello y por su menor coste, se decidió realizar todas las extracciones utilizando TRIzol.

Respecto al normalizador de los datos, tradicionalmente en estudios sobre la endometriosis, se ha utilizado el U6 snRNA como normalizador en distintos tejidos (Braza-Boïls *et al.*, 2014), cultivos celulares (Braza-Boïls *et al.*, 2013, 2015) e incluso biofluidos (Wang *et al.*, 2013), pero existe una gran controversia acerca de su plausibilidad como normalizador (Saare *et al.*, 2017). Entre otros motivos, se trata de un RNA pequeño nuclear con un tamaño mayor al de los miRNAs y con una ruta biogénica distinta, lo que podría introducir un sesgo tanto en su extracción como en su cuantificación mediante RT-qPCR (Schwarzenbach *et al.*, 2015). Por ello, se validó su expresión en los resultados experimentales mediante el software RefFinder y se observó que en ningún cultivo celular el U6 snRNA mostraba la mayor estabilidad. Finalmente, los análisis realizados determinaron al miRNA let-7c como normalizador.

Al igual que los genes que codifican para proteínas, los miRNAs también son transcritos por la RNA polimerasa II, y por tanto están sujetos a los mismos mecanismos de regulación (epigenéticos, por factores de transcripción, etc.). Las hormonas liposolubles, como es el caso del estradiol, pueden regular la expresión génica ya que son capaces de difundir por la membrana plasmática y unirse a los receptores nucleares, translocándose al núcleo y actuando como factores de transcripción al interaccionar con secuencias específicas del DNA, regulando así la transcripción de sus genes diana (Ferraro *et al.*, 2012).

En referencia a los resultados obtenidos en el análisis de la expresión de los miRNAs estudiados tras la estimulación con estradiol, en general se ha observado que el tratamiento con E<sub>2</sub> a 10<sup>-9</sup> M da un efecto mayor que a 10<sup>-8</sup> M, siendo una concentración 10 veces menor. Una hipótesis que explicara estos resultados sería que a mayores dosis se activaran otras rutas de señalización que antagonizaran el efecto sobre el promotor de los miRNAs estudiados. Durante la fase proliferativa del ciclo endometrial los niveles de E<sub>2</sub> aumentan progresivamente, por lo que puede que los resultados reflejen lo ocurrido en el endometrio en los distintos estadios de la fase proliferativa.

En la línea celular epitelial Ishikawa se ha obtenido un aumento estadísticamente significativo de los miRNAs miR-424-5p y miR-29c-3p. En el caso de miR-424-5p dicho incremento está en concordancia con los resultados observados por otros autores en distintas líneas celulares epiteliales ESR1+, como MCF-7 y ZR-75.1 (Ferraro *et al.*, 2012), ambas de cáncer de mama. Gracias a estudios previos en endometriosis (Braza-Boïls *et al.*, 2014) se sabe que el miR-424-5p está implicado en la angiogénesis. La angiogénesis juega un papel importante en la patogénesis de la endometriosis: los implantes endometriales requieren neovascularización para proliferar, invadir la matriz extracelular y establecer la lesión endometrial. La sobreexpresión de miR-424-5p disminuye la actividad angiogénica de su diana, el factor de crecimiento endotelial vascular de tipo A (VEGF-A). Sin embargo, hay evidencia de que la angiogénesis está potenciada en la endometriosis y tras la estimulación con estrógenos, nuestros resultados indican lo contrario. Una posible explicación sería que, tal y como apuntan Zhang y colaboradores (Zhang *et al.*, 2015), una sobreexpresión de miR-424 disminuye la proliferación (mediada por estrógenos) de células epiteliales al inactivar la vía de señalización PI3K/AKT. De este modo miR-424 provocaría una retroalimentación negativa en la expresión de estrógenos. No obstante, se requerirían estudios adicionales para esclarecer el proceso.

Por otra parte, el miR-29c-3p es un microRNA multifuncional implicado en diversos procesos como la angiogénesis y la remodelación de la matriz extracelular. En cuanto a este último proceso, se tiene evidencia de que ciertos miRNAs actúan regulando componentes del sistema de metaloproteinasas, lo que facilita la implantación del tejido endometrial fuera del útero y la formación de lesiones endometriósicas (Gilabert-Estellés *et al.*, 2003). El miR-29c-3p es uno de ellos ya que tiene como diana distintos genes de la matriz extracelular (Braza-Boïls *et al.*, 2014). Estudios anteriores (Kuokkanen *et al.*, 2010) apuntan que está regulado por  $P_4$ , y nuestro análisis sugiere que en células epiteliales de la línea Ishikawa también está regulado por  $E_2$ , viéndose su expresión aumentada.

Por lo que concierne a los resultados obtenidos en las células estromales de endometrio eutópico, al tratarse de cultivos primarios están muy influenciados por las pacientes de las que provienen. Se trata de cultivos que son más inestables y sensibles a los pases de cultivo que las líneas celulares establecidas. Por ello, sería necesario realizar experimentos suplementarios con otros cultivos para comprobar si el aumento de miR-143-3p observado en el cultivo E-1919 tiene significancia a nivel general. En cuanto al papel biológico que desempeña este miRNA en la endometriosis, Ohlsson-Teague y colaboradores indican que el miR-143-3p, en cooperación con otros microRNAs, podría

intervenir en el control del ciclo celular suprimiendo la proliferación celular a través de la represión de la proteína MAPK7 (Ohlsson-Teague *et al.*, 2009). Sin embargo, en la endometriosis la proliferación celular es un proceso fundamental, por lo que los niveles de miR-143-3p deberían estar disminuidos, tal y como ocurre en células de cáncer de mama tras ser estimuladas con E<sub>2</sub> (Yu *et al.*, 2012). Por consiguiente, estudios futuros son imprescindibles para dilucidar el mecanismo real.

Finalmente, en los resultados del presente estudio en células procedentes de endometriomas ováricos no se ha observado ningún cambio significativo. Una posible explicación serían los bajos niveles de expresión de ERα en OMA (Bulun *et al.*, 2010), tal y como se puede observar en la figura 11 A.

## 6. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se ha determinado la presencia de ESR1 en todos los cultivos celulares, así como la viabilidad de la técnica de TRIzol para el aislamiento del RNA total sin sesgar la extracción de los miRNAs de interés. También se ha establecido como normalizador válido let-7c, y finalmente, se ha observado que tras el tratamiento con estradiol a una dosis de  $10^{-9}$  M, los miR-424-5p y miR-29c-3p aumentan en la línea celular epitelial Ishikawa y el miR-143-3p aumenta en los cultivos de células estromales procedentes de endometrio control y eutópico. Sin embargo, son necesarios experimentos adicionales para reproducir las variaciones observadas y estudios complementarios para comprobar el efecto biológico de dichas variaciones en la fisiopatología de la endometriosis.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

ALIMI, Y., IWANAGA, J., LOUKAS, M. AND TUBBS, R. (2018). The clinical anatomy of endometriosis: A review. *Cureus*, 10(9).

ASRM. (1996). Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis. *Fertility and Sterility*, 67(5): 817-821.

AYAZ, G., YASAR, P., OLGUN, C., KARAKAYA, B., KARS, G., RAZIZADEH, N., YAVUZ, K., TURAN, G. AND MUYAN, M. (2019). Dynamic transcriptional events mediated by estrogen receptor alpha. *Frontiers in Bioscience*, 24(2): 245-276

BARRA, F., GRANDI, G., TANTARI, M., SCALA, C., FACCHINETTI, F AND FERRERO, S. (2019). A comprehensive review of hormonal and biological therapies for endometriosis: latest developments. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 19(4): 343-360.

BARRA, F., SCALA, C., MAIS, V., GUERREIRO, S. AND FERRERO, S. (2018). Investigational drugs for the treatment of endometriosis, an update on recent developments. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 27(5): 445-458.

BARTEL, D. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2):281-297

BARTEL, D. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136: 215-233.

BISCHOF, P. AND CAMPANA, A. (1996). A model for implantation of the human blastocyst and early placentation. *Human Reproduction Update*, 2(3): 262-270.

BRAZA-BOÏLS, A., GILABERT-ESTELLÉS, J., RAMÓN, L. A., GILABERT, J., MARÍ-ALEXANDRE, J., CHIRIVELLA, M., ESPAÑA, F. AND ESTELLÉS, A. (2013). Peritoneal fluid reduces angiogenesis-related microRNA expression in cell cultures of endometrial and endometriotic tissues from women with endometriosis. *Plos ONE*, 8(4).

BRAZA-BOÏLS, A., MARÍ-ALEXANDRE, J., GILABERT, J., SÁNCHEZ-IZQUIERDO, D., ESPAÑA, F., ESTELLÉS, A. AND GILABERT-ESTELLÉS, J. (2014). MicroRNA expression profile in endometriosis: its relation to angiogenesis and fibrinolytic factors. *Human Reproduction*, 29(5): 978-988.

BRAZA-BOÏLS, A., SALLOUM-ASFAR, S., MARÍ-ALEXANDRE, J., ARROYO, A. B., GONZÁLEZ-CONEJERO, R., BARCELÓ-MOLINA, M., GARCÍA-OMS, J., VICENTE, V., ESTELLÉS, A., GILABERT-ESTELLÉS, J. AND MARTÍNEZ, C. Peritoneal fluid modifies

the microRNA expression profile in endometrial and endometriotic cells from women with endometriosis. *Human Reproduction*, 30(10): 2292-2302.

BUCKLEY, CH. AND FOX, H. (1989). Biopsy pathology of the endometrium. *Chapman and Hall* (Eds.): 38-47.

BULUN, S., CHENG, Y., PAVONE, M., XUE, Q., ATTAR, E., TRUKHACHEVA, E., TOKUNAGA, H., UTSUNOMIYA, H., YIN, P., LUO, X., LIN, Z., IMIR, G., THUNG, S., SU, E. AND KIM, J. (2010). Estrogen Receptor- $\beta$ , Estrogen Receptor- $\alpha$ , and Progesterone Resistance in Endometriosis. *Seminars in Reproductive Medicine*, 28(01): 036-043.

BURNEY, RO. AND GIUDICE, LC. (2012). Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertility and Sterility*, 98(3): 511–519.

BURNEY, RO., HAMILTON, AE., AGHAJANOVA, L., ET AL. (2009). MicroRNA expression profiling of eutopic secretory endometrium in women with versus without endometriosis. *Molecular Human Reproduction*, 15: 625–631.

CAPORALI, A. AND EMANUELI, C. (2011). MicroRNA regulation in angiogenesis. *Vascular Pharmacology*, 55: 79-86.

CLEMENZA, S., SORBI, F., NOCI, I., CAPEZZUOLI, T., TURRINI, I., CARRIERO, C., BUFFI, N., FAMBRINI, M. AND PETRAGLIA, F. (2018). From pathogenesis to clinical practice: emerging medical treatments for endometriosis. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 51: 92-101.

FERRARO, L., RAVO, M., NASSA, G., TARALLO, R., DE FILIPPO, M. R., GIURATO, G., CIRILLO, F., STELLATO, C., SILVESTRO, S., CANTARELLA, C., RIZZO, F., CIMINO, D., FRIARD, O., BIGLIA, N., DE BORTOLI, M., CICATIELLO, L., NOLA, E. AND WEISZ, A. (2012). Effects of oestrogen on microRNA expression in hormone-responsive breast cancer cells. *Hormones and Cancer*, 3(3): 65-78.

FERRERO, S., EVANGELISTI, G. AND BARRA, F. (2018). Current and emerging treatment options for endometriosis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 19(10): 1109-1125.

FERRERO, S., BARRA, F. AND ROBERTI, U.L. (2018). Current and emerging therapeutics for the management of endometriosis. *Drugs*, 78(10): 995-1012.

FILIGHEDDU, N., GREGNANIN, I., PORPORATO, P., SURICO, D., PEREGO, B., GALLI, L., PATRIGNANI, C., GRAZIANI, A. AND SURICO, N. (2010). Differential expression of microRNAs between eutopic and ectopic endometrium in ovarian endometriosis. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1-29.

FOX, S.I. (2017). *Human physiology*. 15<sup>th</sup> Ed. McGraw-Hill Interamericana. México.

GARCÍA-VELASCO, J. AND QUEA, G. (2007). Fisiopatología de la endometriosis. En: Manual de Reproducción Humana. Remohí J (Ed.). McGraw-Hill-Interamericana. Madrid.

GILABERT-ESTELLÉS, J., BRAZA-BOILS, A., RAMÓN, LA., ZORIO, E., MEDINA, P., ESPAÑA, F. AND ESTELLÉS, A. (2012). Role of microRNAs in gynecological pathology. *Current Medical Chemistry*, 19: 2406–2413.

GILABERT-ESTELLÉS, J., ESTELLÉS, A., GILABERT, J., CASTELLÓ, R., ESPAÑA, F., FALCÓ, C., ROMEU, A., CHIRIVELLA, M., ZORIO, E. AND AZNAR, J. (2003). Expression of several components of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in endometriosis. *Human Reproduction*, 18: 1516–1522.

GIUDICE, L. (2010). Endometriosis. *New England Journal of Medicine*, 362(25): 2389-2398.

GIUDICE, L. AND KAO, L. (2004). Endometriosis. *The Lancet*, 364: 1789-1799.

GUO, S. (2009). Epigenetics of endometriosis. *Molecular Human Reproduction*, 15(10): 587–607.

HENRIET, P., CHEVRONNAY, H. P. AND MARBAIX, E. (2012). The endocrine and paracrine control of menstruation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 358(2): 197-207.

JIANG, C., LI, D., SHI, Z., WANG, L., LIU, M., GE, X., LIU, X., QIAN, Y., WEN, Y., ZHEN, L., LIN, J., LIU, L. AND JIANG, B. (2016). Estrogen regulates miRNA expression: implication of estrogen receptor and miR-124/AKT2 in tumor growth and angiogenesis. *Oncotarget*, 7(24).

KEEFE, D. AND WRIGHT, P. (2007). Reproductive physiology. General Gynecology: The Requisites in Obstetrics and Gynecology. 2: 21-41

KIM, Y., YEO, J., KIM, B., HA, M. AND KIM, V. (2012). Short structured RNAs with low GC content are selectively lost during extraction from a small number of cells. *Molecular Cell*, 46(6): 893-895.

KLINGE, C. (2015). miRNAs regulated by estrogens, tamoxifen, and endocrine disruptors and their downstream gene targets. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 418: 273-297.



KONG, X., XU, X., YAN, Y., GUO, F., LI, J., HU, Y., ZHOU, H. AND XUN, Q. (2014). Estrogen regulates the tumor suppressor miRNA-30c and its target gene, MTA-1, in endometrial cancer. *Plos ONE*, 9(3): e90810.

KUOKKANEN, S., CHEN, B., OJALVO, L., BENARD, L., SANTORO, N. AND POLLARD, J. (2009). Genomic profiling of microRNAs and messenger RNAs reveals hormonal regulation in microRNA expression in human endometrium. *Biology of Reproduction*, 82: 791-801.

MAEKAWA, R., MIHARA, Y., SATO, S., OKADA, M., TAMURA, I., SHINAGAWA, M., SHIRAFUTA, Y., TAKAGI, H., TAKETANI, T., TAMURA, H. AND SUGINO, N. (2019). Aberrant DNA methylation suppresses expression of estrogen receptor 1 (ESR1) in ovarian endometrioma. *Journal of Ovarian Research*, 12(1).

MARÍ-ALEXANDRE, J., GARCÍA-OMS, J., BARCELÓ-MOLINA, M., GILABERT-AGUILAR, J., ESTELLÉS, A., BRAZA-BOÏLS, A. AND GILABERT-ESTELLÉS, J. (2015). MicroRNAs and angiogenesis in endometriosis. *Thrombosis Research*, 135: S38-S40.

MARÍ-ALEXANDRE, J., BARCELÓ-MOLINA, M., OLCINA-GUILLEM, M., GARCÍA-OMS, J., BRAZA-BOÏLS, A. AND GILABERT-ESTELLÉS, J. (2016)(a). microRNAs: New players in endometriosis. *World Journal of Obstetrics and Gynecology*, 5(1): 28.

MARÍ-ALEXANDRE, J., SÁNCHEZ-IZQUIERDO, D., GILABERT-ESTELLÉS, J., BARCELÓ-MOLINA, M., BRAZA-BOÏLS, A. AND SANDOVAL, J. (2016)(b). MiRNAs regulation and its role as biomarkers in endometriosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(1), p.93.

OHLSSON-TEAGUE, E., PRINT, C. AND HULL, M. (2010). The role of microRNAs in endometriosis and associated reproductive conditions. *Human Reproduction*, 16: 142-165.

PAN, Q., LUO, X., TOLOUBEYDOKHTI, T. Y CHEGINI, N. (2007). The expression profile of micro-RNA in endometrium and endometriosis and the influence of ovarian steroids on their expression. *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine*, 13(11): 797-806.

PANIR, K., SCHJENKEN, J., ROBERTSON, S. AND HULL, M. (2018). Non-coding RNAs in endometriosis: a narrative review. *Human Reproduction Update*, 24(4): 497-515.

PARASAR, P., OZCAN, P. AND TERRY, K. (2017). Endometriosis: Epidemiology, diagnosis and clinical management. *Current Obstetrics and Gynecology Reports*, 6(1): 34-41.

RAMÓN, LA., BRAZA-BOÏLS, A., GILABERT-ESTELLÉS, J., GILABERT, J., ESPAÑA, F., CHIRIVELLA, M. AND ESTELLÉS, A. (2011). MicroRNAs expression in endometriosis and their relation to angiogenic factors. *Human Reproduction*, 26: 1082–1090.

SAARE, M., REKKER, K., LAISK-PODAR, T., RAHMIOGLU, N., ZONDERVAN, K., SALUMETS, A., GÖTTE, M. AND PETERS, M. (2017). Challenges in endometriosis miRNA studies — From tissue heterogeneity to disease specific miRNAs. *Molecular Basis of Disease*, 1863(9): 2282-2292.

SAMPSON, J. (1927). Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissues into the peritoneal cavity. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 14: 422- 469.

SASSON, I. AND TAYLOR, H. (2008). Stem cells and the pathogenesis of endometriosis. *Annals New York Academy of Sciences*, 1127(1): 106-115.

SCHWARZENBACH, H., DA SILVA, A. M., CALIN, G. Y PANTEL, K. (2015). Data normalization strategies for microRNA quantification. *Clinical Chemistry*, 61(11): 1333-1342.

VALBUENA, D. AND SIMÓN, C. (2009). Regulación hormonal del endometrio humano, en: *El endometrio humano: desde la investigación a la clínica.*, p. 17. Ed. Médica Panamericana. Madrid, 12-17.

VERCELLINI, P., VIGANÒ, P., SOMIGLIANA, E. AND FEDELE, L. (2013). Endometriosis: pathogenesis and treatment. *Nature Reviews Endocrinology*, 10: 261-275.

VIVACQUA, A., MUOIO, M., MIGLIETTA, A. AND MAGGIOLINI, M. (2019). Differential microRNA landscape triggered by estrogens in cancer associated fibroblasts (CAFs) of Primary and Metastatic Breast Tumors. *Cancers*, 11(3): 412.

WANG, W., ZHAO, Y., HAN, B., HONG, S. AND CHEN, Y. (2013). Circulating microRNAs identified in a genome-wide serum microRNA expression analysis as noninvasive biomarkers for endometriosis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 98(1).

WINTER, J., JUNG, S., KELLER, S., GREGORY, R. AND DIEDERICH, S. (2009). Many roads to maturity: miRNAs biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology*, 11(3): 228-234.

WORLD MEDICAL ASSOCIATION (WMA) (2014). World medical association declaration of Helsinki: Ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*, 310(20): 2191–2194.

XIE, F., XIAO, P., CHEN, D., XU, L. AND ZHANG, B. (2012). miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Molecular Biology*, 80(1), 75-84.

YU, X., ZHANG, X., DHAKAL, I. B., BEGGS, M., KADLUBAR, S. AND LUO, D. (2012). Induction of cell proliferation and survival genes by estradiol-repressed microRNAs in breast cancer cells. *BMC Cancer*, 12(1).

ZHANG, H., WANG, X., CHEN, Z. AND WANG, W. (2015). MicroRNA-424 suppresses estradiol-induced cell proliferation via targeting GPER in endometrial cancer cells. *Cellular and Molecular Biology*, 61(7): 96-101.

ZITO, G., LUPPI, S., GIOLO, E., MARTINELLI, M., VENTURIN, I., DI LORENZO, G. AND RICCI, G. (2014). Medical treatments for endometriosis-associated pelvic pain. *Biomed Research International*, 1-12.

## 8. ANEXOS

**Tabla suplementaria 1.** Resultados de la cuantificación de la expresión de los miRNAs estudiados por RT-qPCR en las distintas condiciones y cultivos celulares: procedentes del endometrio de mujeres control (E-1980 y E-1924), y de endometrio eutópico (E-1919 y E-1971) y OMA (E-1935) de pacientes con endometriosis.

E-1980		miR-99a-5p		miR-143-3p		miR-424		miR-29c-3p	
		Media	ETM	Media	ETM	Media	ETM	Media	ETM
no tto	0h	1,000	0,175	1,000	0,073	1,000	0,024	1,000	0,007
	6h	1,350	0,236	1,274	0,099	1,519	0,146	0,956	0,382
	12h	1,276	0,139	1,216	0,161	1,451	0,321	0,416	0,401
	24h	1,503	0,053	1,889	0,204	2,581	0,463	1,592	0,354
no tto	0h	1,000	0,175	1,000	0,073	1,000	0,024	1,000	0,007
vector	6h	1,100	0,158	1,274	0,144	1,289	0,071	1,447	0,178
	12h	1,494	0,128	1,422	0,064	1,589	0,159	0,998	0,077
	24h	1,549	0,095	1,148	0,103	2,445	0,376	1,697	0,249
no tto	0h	1,000	0,175	1,000	0,073	1,000	0,024	1,000	0,007
10-8M	6h	1,243	0,300	1,239	0,014	1,417	0,149	1,210	0,056
	12h	1,749	0,133	1,371	0,475	1,396	0,211	1,269	0,408
	24h	1,403	0,236	1,517	0,006	2,685	0,074	0,890	0,087
no tto	0h	1,000	0,175	1,000	0,073	1,000	0,024	1,000	0,007
10-9M	6h	1,442	0,109	1,593	0,122	1,908	0,091	1,273	0,055
	12h	1,306	0,171	1,440	0,080	1,802	0,120	1,245	0,188
	24h	1,363	0,121	1,120	0,249	1,962	0,119	1,098	0,066

E-1924		miR-99a-5p		miR-143-3p		miR-424		miR-29c-3p	
		Media	ETM	Media	ETM	Media	ETM	Media	ETM
no tto	0h	1,000	0,223	1,000	0,052	1,000	0,391	1,000	0,046
	6h	1,114	0,123	1,544	0,195	0,509	0,077	1,589	0,060
	12h	0,657	0,213	1,007	0,274	0,523	0,174	1,377	0,128
	24h	1,062		0,816	0,167	0,382	0,074	1,066	0,422
no tto	0h	1,000	0,223	1,000	0,052	1,000	0,391	1,000	0,046
vector	6h	0,995	0,919	1,859	0,302	1,117	0,274	1,505	0,148
	12h	0,913	0,310	0,921	0,130	0,486	0,048	1,223	0,097
	24h	2,373		2,815	0,666	1,561	0,413	3,342	0,173
no tto	0h	1,000	0,223	1,000	0,052	1,000	0,391	1,000	0,046
10-8M	6h	0,913		1,263	0,338	0,973	0,191	1,101	0,249
	12h	0,319	0,069	1,461	0,078	1,222	0,282	1,387	0,213
	24h	0,913	0,431	0,850	0,139	0,864	0,047	1,488	0,024
no tto	0h	1,000	0,223	1,000	0,052	1,000	0,391	1,000	0,046
10-9M	6h	1,391	0,322	1,845	0,439	1,085	0,304	1,723	0,098
	12h	1,248	0,643	1,749	0,281	0,823	0,153	1,107	0,142
	24h	1,220	1,010	1,849	0,427	1,418	0,265	2,422	0,559

E-1919		miR-99a-5p		miR-143-3p		miR-424		miR-29c-3p	
		Media	ETM	Media	ETM	Media	ETM	Media	ETM
no tto	0h	1,000	0,247	1,000	0,361	1,000	0,252	1,000	0,264
	6h	0,520	0,121	0,946	0,021	1,162	0,104	1,115	0,241
	12h	0,719	0,122	0,947	0,058	1,500	0,159	1,101	0,110
	24h	0,667	0,085	1,120	0,082	1,077	0,437	1,164	0,083
no tto	0h	1,000	0,247	1,000	0,361	1,000	0,252	1,000	0,264
vector	6h	0,667	0,085	1,097	0,054	1,077	0,437	0,810	0,105
	12h	0,557	0,089	0,929	0,249	1,475	0,169	1,168	0,015
	24h	0,678	0,078	1,137	0,073	1,848	0,090	1,181	0,058
no tto	0h	1,000	0,247	1,000	0,361	1,000	0,252	1,000	0,264
10-8M	6h	0,721	0,104	0,970	0,080	1,245	0,161	1,096	0,070
	12h	0,805	0,122	0,988	0,107	1,666	0,140	1,344	0,229
	24h	0,874	0,026	1,457	0,169	2,158	0,404	1,424	0,176
no tto	0h	1,000	0,247	1,000	0,361	1,000	0,252	1,000	0,264
10-9M	6h	0,604	0,217	1,406	0,108	1,563	0,152	1,366	0,177
	12h	0,902	0,188	1,258	0,059	1,470	0,045	1,193	0,091
	24h	0,683	0,020	0,916	0,089	1,238	0,030	1,147	0,065

E-1971		miR-99a-5p		miR-143-3p		miR-424		miR-29c-3p	
		Media	ETM	Media	ETM	Media	ETM	Media	ETM
no tto	0h	1,000	0,204	1,000	0,037	1,000	0,032	1,000	0,058
	6h	1,014	0,054	1,379	0,101	1,480	0,177	1,191	0,128
	12h	0,913	0,093	1,262	0,063	1,452	0,131	1,098	0,085
	24h	0,772	0,080	1,367	0,035	1,344	0,034	0,933	0,060
no tto	0h	1,000	0,204	1,000	0,037	1,000	0,032	1,000	0,058
vector	6h	0,514	0,122	0,928	0,349	0,668	0,156	0,685	0,106
	12h	0,653	0,110	0,945	0,019	0,591	0,042	0,593	0,047
	24h	0,467	0,056	0,544	0,027	0,430	0,018	0,407	0,020
no tto	0h	1,000	0,204	1,000	0,037	1,000	0,032	1,000	0,058
10-8M	6h	0,544	0,002	0,804	0,074	0,555	0,049	0,599	0,069
	12h	0,635	0,042	0,701	0,104	0,425	0,024	0,495	0,037
	24h	0,596	0,054	1,035	0,050	0,905	0,145	0,802	0,094
no tto	0h	1,000	0,204	1,000	0,037	1,000	0,032	1,000	0,058
10-9M	6h	0,625	0,024	0,903	0,064	0,755	0,029	0,739	0,040
	12h	0,813	0,239	0,791	0,082	0,660	0,081	0,744	0,100
	24h	0,757	0,146	1,075	0,052	1,554	0,331	1,004	0,130

ISHIKAWA		miR-99a-5p		miR-143-3p		miR-424		miR-29c-3p	
		Media	ETM	Media	ETM	Media	ETM	Media	ETM
no tto	0h	1,000	0,137	1,000	0,098	1,000	0,113	1,000	0,013
	6h	1,590	0,197			0,547		0,958	
	12h	1,030	0,069	0,508	0,100	0,675	0,059	1,027	0,098
	24h	1,192	0,044	0,635	0,326	0,596	0,059	0,854	0,029
no tto	0h	1,000	0,137	1,000	0,098	1,000	0,113	1,000	0,013
vector	6h	0,936	0,104	3,359	0,821	0,702		0,865	0,035
	12h	0,978	0,056	0,755	0,026	0,947	0,192	1,298	0,095
	24h	1,037	0,105	0,488		0,842	0,098	0,825	0,128
no tto	0h	1,000	0,137	1,000	0,098	1,000	0,113	1,000	0,013
10-8M	6h	0,963	0,066	0,831		0,268	0,100	0,596	0,039
	12h	0,983	0,049	0,944	0,101	0,440	0,194	0,661	0,186
	24h	1,061	0,068	1,075	0,445	0,536	0,089	1,133	0,079
no tto	0h	1,000	0,137	1,000	0,098	1,000	0,113	1,000	0,013
10-9M	6h	1,095	0,119	1,942	0,262	0,949	0,125	1,414	0,062
	12h	1,056	0,053	1,374	0,328	1,870	0,165	1,840	0,135
	24h	1,156	0,046	1,005	0,100	1,466	0,057	1,445	0,054

**Tabla suplementaria 2.** Contenido en GC de los miRNAs de estudio.

miRNA	Secuencia 5' → 3'	Total nt	C	G	% GC
let-7c	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU	22	0	9	40,91
miR-99a-5p	AACCCGUAGAUCCGAUCUUGUG	22	6	5	50,00
miR-143-3p	UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC	21	4	6	47,62
miR-424	CAGCAGCAAUUCAUGUUUUGAA	22	4	4	36,36
miR-29c-3p	UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA	22	4	4	36,36